Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева»

Факультет биотехнологии и промышленной экологии

Кафедра биотехнологии

Выпускная квалификационная работа

на тему:

«Эволюционная динамика популяций молочнокислых бактерий и сообщества кефирных грибков в условиях селективного отбора агрегирующих форм»

Заведующий кафедрой

д.т.н., профессор В.И. Панфилов

Руководитель

от кафедры биотехнологии

уч. степень, должность к.б.н., доцент А.В. Белодед

Научный руководитель (конультант)

уч. степень, должность к.б.н., доцент А.В. Белодед

Обучающийся В.М. Вахтинский

Москва, 2020

АННОТАЦИЯ

выпускной квалификационной работы бакалавра Вахтинского В.М.

по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология»

на тему «Эволюционная динамика популяций молочнокислых бактерий сообществ кефирных грибков в условиях селективного отбора агрегирующих форм»

В квалификационной работе исследована эволюционная динамика штамма-продуцента молочной кислоты Lactobacillus paracasei 4079, а также проведен анализ микробного профиля сообщества кефирных грибков. Молочная кислота признана абсолютно безопасной (GRASS) Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) и широко используется в пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве и косметологии. Также за рубежом началось активное использование её в качестве сырья для производства биоразлагаемого пластика.

Целью данной работы являлось получение агрегирующего штамма на основе молочнокислых бактерий Lactobacillus paracasei 4079, исследование его биохимических и генетических отличий от исходного и возможность его внедрения в существующее сообщество кефирных грибков и совместного культивирования с гранулообразующими микроорганизмами кефирных грибков для оптимизации производства молочной кислоты.

В литературном обзоре представлены общие механизмы адаптации микроорганизмов, а также подробно рассмотрены стратегии выживания, используемые лактобактериями, отдельно рассмотрены взаимоотношения внутри некоторых микробных сообществ кефирных грибков и механизмы адаптации всего сообщества в целом.

В разделе материалы и методы описана схема проведения селекции штамма молочнокислых бактерий Lactobacillus paracasei 4079, а также методики проведенных опытов по сравнительному анализу исходного, агрегирующего штаммов и сообщества кефирных грибков.

Показано, что штамм подвергшийся селекции отличался по морфологии отдельных клеток, но не отличался по морфологии колоний. На основании проведенных опытов значимых отличий в метаболизме и оптимальных условиях культивирования между агрегирующим и неагрегирующим штаммами выявлено не было. Для определения генетических различий и проверки возможности внедрения данных микрорганизмов в существующее сообщество кефирных грибков требуются дополнительные исследования с применением более совершенных методик.

Оглавление

1 ВВЕДЕНИЕ

В широком смысле значение слова «эволюция» тождественно развитию, не только отдельных живых организмов, видов или популяций, но и различных систем, общества, способов организации и взаимодействия.

Процесс эволюции начался на планете еще до зарождения живых организмов, представляя собой постепенное усложнение химических молекул и последующее образование ими белков, углеводов и других полимеров, а затем и объединение в органеллы.

С появлением жизни процесс эволюции многократно ускорился, перейдя из химической плоскости в биологическую, диктующую свои законы и закономерности.

Эволюцию, как биологический процесс, изучают на различных организмах и уровнях организации, однако, едва ли не лучшим вариантов для этого являются микроорганизмы по целому ряду причин: небольшой геном, изменения в котором проще фиксировать, высокая скорость роста, позволяющая получать результаты в разы быстрее, огромное разнообразие видов, дающее широкий простор для экспериментов, автономность отдельных клеток, в отличие от многоклеточных организмов.

Однако большая скорость изменчивости микроорганизмов может стать и проблемой, например для штаммов, используемых в промышленности. Так, возможно постепенное вырождение их полезных свойств или развитие вредных. «Все течет, все меняется», мутации в популяции накапливаются, приобретаются новые признаки, другие, наоборот, утрачиваются, именно поэтому крайне важно понять эволюционные закономерности и механизмы адаптации.

С другой стороны, изменчивость и адаптацию микроорганизмов можно использовать для направленной эволюции и развития определенных признаков у микроорганизмов, ими ранее не обладающих. Этот процесс называется селекцией, именно она и стала первым инструментом для получения промышленных штаммов. И хотя в последнее большое распространение получила генная инженерия, селекционные методы не утратили своей значимости.

Селекция обладает рядом преимуществ перед генной инженерией: во-первых, это простота процесса и аппаратурного оформления, во вторых, селекция (без дополнительного мутагенеза) только ускоряет отбор необходимых признаков, не вмешиваясь в геном, что делает селекционные штаммы более устойчивыми к потере приобретенных признаков.

Селекция не лишена также и недостатков, во-первых помимо нужных признаков могут отбираться и вредные, в отличие от четкой вставки нужных генов при генной инженерии.

Именно поэтому всё чаще используются комбинированные методы: селекцией и последующим изучением адаптаций выявляют гены, помогающие организму приспосабливаться к тем или иным условиям, затем длительным и направленных воздействием отбирают наиболее приспособленные, в итоге, в генной инженерии используются их гены, для вставки в другие микроорганизмы. Интересным объектом для реализации таких методов могли бы стать молочнокислые бактерии, широко использующиеся в самых разных биотехнологиях: от пищевой промышленности и получения молочной кислоты до разработки пробиотических препаратов и получения противомикробных соединений.

Молочная кислота является абсолютно безопасной и активно применяется в пищевой промышленности, сельском хозяйстве и ветеринарии. Стоит также отметить, что активно ведутся работы по созданию на её базе полимеров, как основы для биоразлагаемых упаковочных материалов, так и для создания имплантов. Поэтому по всему миру проводятся исследования, направленные на повышение качества, производительности и экономической эффективности производства. Например, поиск высокопроизводительных штаммов или наиболее дешевых субстратов и источников азота/факторов роста. Одним из направлений оптимизации производства является селекция культур молочнокислых бактерий. Многочисленные работы посвящены повышению устойчивости штаммов к различного рода стрессовым воздействиям в результате длительной селекции.

Интересным подходом к повышению эффективности производства молочной кислоты могло бы стать изменение консистенции культивируемой биомассы, например, переход от планктонной культуры к биопленкам или гранулообразованию. Формирование гранул и ведение процесса брожения с иммобилизованными таким образом клетками могло бы обеспечить легкое

отделение биомассы от продуктов биосинтеза, что, например, ускорит стадию фильтрации в случае использования мембранной технологии получения молочной кислоты. Однако, работ, направленных, на получение агрегированных форм многоклеточных образований молочнокислых бактерий, найдено не было. Нет также данных об успешном создании сообщества молочнокислых бактерий с кем-либо, встречаются в основном описания уже существующих в природе сообществ, выделенных на различных молочных комбинатах или полученных от местного населения[2],[7],[98].

Помимо практической ценности, заключающейся в упрощенной фильтрации культуральной жидкости, исследование имеет и научную ценность, заключающуюся в определении физиологических, биохимических и генетических изменений, которые сопровождают появление таких «многоклеточных» форм бактерий.

2 ЗАРОЖДЕНИЕ ЖИЗНИ

Согласно теории Опарина-Холдейна, подтвержденной экспериментом Миллера-Юри, в доисторическом мировом океане под воздействием ультрафиолета и электрических разрядов из метана, аммиака, воды и углекислого газа произошел химический синтез аминокислот, сахаров и нуклеиновых кислот. Далее на протяжении миллионов лет происходило их взаимодействие между собой и эволюция до более сложных молекул, которые затем объединились в органеллы и первый организм[24],[87].

2.1 РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И ПЕРВЫЕ ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Микробный мир характеризуется огромным разнообразием представителей. Одноклеточные формы жизни появились на планете более 3,8 миллиардов лет назад. Именно они и сделали землю такой, какой мы видим её сегодня. Их биологическая активность постепенно изменяла состав мирового океана, литосферы и атмосферы. Они и сегодня играют важнейшую роль в поддержании различных экосистем[30],[32]. Только среди микроорганизмов встречаются все восемь типов питания. И даже при одном и том же типе питания метаболические пути могут сильно различаться. Всё это разнообразие обусловлено эволюцией.[94].

Первыми живыми организмами были археи, которые существовали в бескислородной атмосфере, получали энергию за счет окисления неорганических субстратов, таких как сера или аммиак, были способны к фиксации углекислого газа из атмосферы, а также метаногенезу. Также, учитывая состояние мирового океана того периода, они были экстремофилами, приспособленными к повышенным температурам, низкому pH и высокому осмотическому давлению[11],[30]. Среди первых археев был также распространен аноксигенный фотосинтез[21].

Эволюция многоклеточности началась практически сразу за появлением жизни на планете[71]. Также быстрое развитие многоклеточности в лабораторных условиях позволяет говорить, что она появилась на земле вслед за развитием жизни на земле, а не 2 млрд лет назад, когда были датированы древнейшие многоклеточные цианобактерии[52],[71].

В процессе эволюции произошло несколько скачкообразных «усложнений» в организации жизни, таких как появление ядра, образование многоклеточности, дифференциация клеток по функциям и др. Для понимания сегодняшней биосферы важно найти ответ на вопрос: почему (какие преимущества это дает) произошли эти изменения[71].

Из всех переходов между уровнями организации наиболее интересным является переход от одноклеточности к многоклеточности. Именно многоклеточность сместила понимание того, что такое один организм. Многоклеточные организмы по-другому подвержены законам физики: повышается значение гравитации, а Броуновское движение наоборот становится не значимым. Многоклеточность также открыла новую плоскость для эволюции – дифференциацию клеток по функциям, размерам, морфологии[71],[101].

2.2 ПОЯВЛЕНИЕ ОКСИГЕННОГО ФОТОСИНТЕЗА И АЭРОБНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Около 2,5 миллиардов лет назад произошло появление кислородного фотосинтеза у цианобактерий: на тот момент отдельно существовала и фотосистема 1, и фотосистема 2, объединение которых с кальций-марганцевым белковым комплексом, позволило им перейти к оксигенному фотосинтезу с использованием качественно нового донора электронов – воды[34].

Биосфера начала производить кислород, который более 500 миллионов лет расходовался на окисление мирового океана и донных пород, а затем еще около 1 миллиарда лет на окисление горных пород когда наконец он стал накапливаться в атмосфере. За этот период произошло кардинальное изменение условий: раньше в отдельных местах скопления фотосинтезирующих цианобактерий образовывались аэробные карманы, вся же остальная среда была анаэробной. Теперь анаэробные условия стали скорее исключением, формируясь только в определенных замкнутых пространствах, например болотах[11]. Именно повышение концентрации кислорода в атмосфере стало движущей силой перехода к аэробному или аэротолерантному существованию микроорганизмов.

2.3. ТИПЫ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ

В ходе эволюции микроорганизмы искали для себя различные экологические ниши. Для своего выживания с другими микро- и макроорганизмами они выработали различные стратегии взаимодействия. Чаще всего среди микроорганизмов наблюдается антагонизм в виде конкуренции за ограниченные ресурсы. В ходе этой борьбы некоторые виды приобрели конкурентное преимущество, они могли подавлять других за счет синтеза специфических соединений. Часть бактерий и грибов перешли к паразитизму, чаще на макроорганизмах, другие стали хищниками. Сравнительно небольшое количество микроорганизмов вступают во взаимовыгодную кооперацию друг с другом или с макроорганизмами. Гораздо чаще проявляется комменсализм, выгодный только для микроорганизмов.

2.3.1 СИМБИОЗ

Симбиоз – это вид взаимоотношений между различными видами, при котором выгоду получает хотя бы один из участников (ранее симбиозом называлось взаимовыгодное сосуществование, ныне называемое мутуализмом). Современное более широкое понятие включается в себя также комменсализм и паразитизм при которых второй участник не имеет никого эффекта или получает отрицательный эффект от совместного существования, соответственно[19].

2.3.1.1 МУТУАЛИЗМ

В ходе адаптации многие микроорганизмы вступили мутуалистические взаимоотношения с растениями и животными[44]. Так бактерии родов Azotobacter, Rhisobium и цианобактерии родов Nostoc стали симбионтами растений выполняющими функцию фиксации азота. Они выработали специальные Nod-факторы, которые в микроконцентрациях вызывают деформацию корней и образование клубеньков. Клубеньки являются защитным механизмом от кислорода, подавляющего ферменты цикла азотфиксации. Клубеньки формируются из нескольких слоев клеток растения, что снижает диффузию кислорода вглубь и нескольких слоев клеток азотфиксирующих бактерий с активным аэробным метаболизмом, которые потребляют диффундировавший кислород, то есть в центре клубенька создается анаэробная зона[73].

Процесс усвоения молекулярного азота очень энергозатратен и требует 16 моль АТФ на один моль азота. Поэтому растения, в свою очередь снабжает симбионтов энергией[73]. Водоросли, которые так же как и другие растения, не в состоянии фиксировать молекулярный азот, также вступают в мутуалистические отношения с бактериями, например одноклеточная водоросль Chlorella vulgaris и некоторые представители рода Rhizobium, фиксирующие молекулярный азот[11],[15].

Зачастую бактерии вступают в мутуалистические отношения между собой, так Lactobacillus leichmannii 313 для роста требуется витамин B12, который он синтезировать не может, зато он может синтезировать факторы роста для Leuconostoc citrovorum 8081, который, в свою очередь, может синтезировать витамин. И два микроорганизма снабжают друг друга необходимым для роста соединениями[99]. Схожие взаимоотношения возникают у одноклеточных водорослей, которые, являясь эукариотами, не могут синтезировать цианокобаламин, и бактерии вида Chlamydomonas reinhardtii, способной к синтезу этого витамина[11],[15].

Отдельно стоит отметить эндосимбиоз эукариота и цианобактерии. который со временем привел к появлению растений. В пользу этого говорит тот факт, что хлоропласты имеют две мембраны (внешняя – вакуоль хозяина, внутренняя – мембрана цианобактерии, без клеточной стенки), собственную молекулу ДНК, РНК и независимую систему синтеза белков, также они размножаются бинарным делением. Это объединение поставило водоросли на новую ступень организации[11].

Огромное количество микроорганизмов имеют мутуалистические отношения с различными животными. Рубцы домашнего скота содержат от 350 (у свиньи) до 700 (у коровы) видов микроорганизмов[44]. И хотя многие из них состоят с травоядными в комменсализме (ниже будет рассмотрено подробнее) там присутствуют бактерии, простейшие и цианобактерии, которые исполняют целый ряд функций (описанных ниже)[69],[84].

Также стоит отметить сложные симбиотические отношения, возникающие между кораллами и различными одноклеточными микроорганизмами (бактериями, водорослями и археями). Причем, между организмами наблюдается своё особое сотрудничество, которое может быть построено на обмене широкого спектра компонентов питания или защите от паразитов[96].

У жвачных животных отсутствуют собственные целлюлазы, поэтому расщеплением биополимеров занимаются эндосимбионты. Травоядные также неспособны к синтезу витаминов, необходимых для нормального функционирования, поэтому получают их от своих эндосимбионтов, снабжая их питательными веществами взамен. Чаще всего животные, с одинаковым типом питания имеют схожую микрофлору кишечника, независимо от ареала обитания, но бывают и исключения[69],[84].

Грамотрицательные бактерии вида Vibrio fischery вступают в мутуалистические отношения с целым рядом морских обитателей, преимущественно донных. Они обитаю в специальном органе – фотофоре моллюсков или рыб. Хозяин снабжает их питательными веществами, а они в свою очередь светятся в темноте, маскируя хозяина или наоборот приманивая добычу. Главным отличием морских обитателей от наземных светлячков является то, что светлячки сами синтезируют люциферин, в то время, как морские обитатели прибегают к помощи бактерий[44],[51].

Иногда мутуализм является единственной возможностью для выживания, например в сообществах, состоящих из вторичных бродильщиков и метаногенов. В ходе этого взаимодействия вторичные бродильщики снабжают метаногенов субстратом, а те, потребляя его, в свою очередь, предотвращают ингибирование роста бродильщиков продуктами их жизнедеятельности[36].

Отдельно стоит отметить мутуалистические отношения человека с рядом бактерий, обитающих в кишечнике. Представители родов Lactobacillus, Bifidobacterium и других оказывают на человека положительный эффект: они подавляют рост нежелательной микрофлоры кишечника и защищают хозяина от ряда заболеваний, более того, они оказывают благотворное влияние на его иммунитет, а также производят ряд витаминов группы B, которые человек не в состоянии синтезировать самостоятельно[6].

2.3.1.2 КОМЕНСАЛИЗМ

В кишечнике человека обитает более 1000 различных видов бактерий, пребывающих в разных отношениях с хозяином на разных этапах жизни[44]. Многие микроорганизмы состоят с человеком в комменсализме, используя его кишечник в качестве среды обитания и не принося ему никакого вреда или пользы[53],[100]

Ярким примером такого существования является E. coli, которая при обитании в организме человека потребляет не усвоенные человеком компоненты питания и составляет конкуренцию другим видам, попавшим в кишечник. Однако возможно случаи появления у неё факторов вирулентности, которые могут привести к развитию значительного числа заболеваний, превратив первоначально безобидную бактерию в патогена[65] Так при ослабленном иммунитете или попадании в другие органы и полости человека она может вызывать заражение крови и менингиты[47].

Еще одним комменсалом человека является грамотрицательная бактерия Neisseria meningitidis, которая живет в носоглотке примерно 30% населения земли. В нормальном состоянии она не представляет угрозы, но при появлении у неё факторов вирулентности она способна проникать сквозь клетки эпителия в кровоток, вызывая заражение крови, или проникает в мозг, вызывая менингит[70].

Примерно 40% человечества являются носителями Staphylococcus aureus, который, обитая на коже не вызывает никаких отрицательных эффектов. Однако при ослаблении иммунитета и накоплении определенного количества этих микроорганизмов на ограниченном пространстве у них по средством чувства кворума (который будет рассмотрен ниже см. раздел 5 чувство кворума) включается механизм вирулентности. Стафилококки являются одной из главных причин внутрибольничных инфекций, а также главной проблемой послеоперационных и раневых инфекция[88].

2.3.1.3 ПАРАЗИТИЗМ

Широко распространены микробные и грибные паразиты человека, животных и растений. Согласно статистике случаев заражения крови грамотрицательные и грамположительные бактерии составляют более 90% от общего числа возбудителей, остальное приходится на грибные культуры[48]. Особенно опасным является то, что большей частью они вызваны условно патогенными микроорганизмами, которые встречаются повсеместно, однако не наносят вреда здоровым организмам или если не попадают в специфические условия или приобретают факторы вирулентности[83]. Среди наиболее частых причин больничных инфекций выделяют грамотрицательные бактерии видов Klebsiella pneumoniae, E. coli, Pseudomonas aeruginosa, и грамположительных видов: Staphylococcus aureus и ряда энтерококков. При попадании в ослабленный организм, иммунитет которого не может их подавить, и начинают активно делиться, лизируя клетки хозяина для получения компонентов питания, параллельно они могут выделять некоторые токсины[31],[26],[45].

В природе бактерии рода Klebsiella обитают в почве, некоторые штаммы способны к фиксации азота, факультативные анаэробы. Некоторые подвиды, выбрав в качестве экологической ниши организмы ослабленных пациентов, выработала устойчивость к целому ряду антибиотиков, что существенно усложняет борьбу с ними, так в 1996 году в США была выделен штамм, способный гидролизовать все используемые β-лактамные антибиотики, (цефалоспорины, карбапенемы, пенициллины, монобактамы) и даже ингибитора лактамаз, применяемые для борьбы с резистентностью[26].

Схожая проблема высокой антибиотикорезистентности существует и у грамположительных бактерий вида Staphylococcus aureus[45]. Также по мере развития он способен выделять α-токсин, подавляющий иммунный ответ человека и усугубляющий заражение крови[61]. О местах обитания и других способах выживания было упомянуто ниже. Механизм образования вирулентности будет разобран в разделе чувство кворума.

Среди облигатных патогенов можно выделить грамотрицательных бактерий вида Yersinia pestis, вызвавших несколько мировых эпидемий чумы: начиная от чумы Юстиниана 541 – 544 годов и Черной смерти 1347 – 1353 годов, заканчивая эпидемией легочной чумы в Китае 1899 – 1900 годов и периодическими вспышками чумы в настоящее время. Считается, что Yersinia pestis появилась в ходе мутаций из Yersinia pseudotuberculosis около 20 000 лет назад. Их переносчиками являются блохи вида Xenopsylla cheopis, живущие на теле мелких грызунов, чаще крыс. Патоген обитает в ротовой полости блох, живущих на крысах. В ходе эволюции они приспособились к образованию своеобразной биопленки в зобе насекомого, которая мешает крови жертвы поступать в желудок и блоха, испытывая постоянный голод заражает большее количество животных или людей. Другим механизмом приспособления является синтез противофагоцитозной слизи, которая защищает патогена от имунного ответа хозяина. В 1893 году была разработана вакцина, состоящая из убитых клеток Yersinia pestis. Однако уже в 1909-1910 вспыхнула эпидемия легочной чумы в Маньчжурии. Оказалось, что при таком способе заражения удается обойти иммунную систему и вакцинация бесполезна. Только с развитием антибиотиковв середине XX века удалось практически победить чуму. Однако в наши дни стали появляться штаммы, устойчивые к применявшимся ранее антибиотикам, например стрептомицину[78],[102].

Другим примером облигатных патогенов является Rickettsia prowazekii, вызывающая брюшной и сыпной тифы. Рикеттсии являются α-протеобактериями, которые в ходе эволюции утратили способность к свободному делению и способны размножаться только внутри клеток эукариот, в отличие от чумы, они не обладают противофагоцитозной защитой, однако при их лизисе выделяется эндотоксин, который убивает лимфоциты. Также они смогли адаптироваться в выживанию в ротовой полости платяных вшей вида Pediculus corporis, которые стали их векторами[95].

Существует также огромное количество паразитов, хозяевами которых являются простейшие, так представители родов Chamydiales и Ricketsiales способны паразитировать на амёбах. Интересной также является их широкая специфичность к хозяевам, обусловленная сравнительно большим геномом для одноклеточных патогенов, относительно свободно живущих родственных микроорганизмов[25].

2.3.1.4 ХИЩНИЧЕСТВО

В ходе поиска новых экологических ниш некоторые виды микроорганизмов стали хищниками. Чаще всего хищниками являются эукариоты по отношению к прокариотам, однако есть ряд хищников-прокариот[76].

Так грамотрицательная протеобактерия Myxococcus xanthus с помощью специальных рецепторов может находить колонии-жертвы и прорастать в их направлении, постепенно окружая их. Благодаря способности синтезировать внешние везикулы, содержащие целый пул гидролитических ферментов и ряд вторичиных метаболитов она уничтожает колонии-жертвы и усваивает выделившиеся питательные вещества[75],[16].

Еще одним примером хищничества являются грамотрицательные анаэробные бактерии Vampirovibrio chlorellavorus, которые прикрепляясь к одноклеточным водорослям, постепенно расщепляют внутренности жертвы и потребляют образующиеся компоненты питания[50],[76].

Представители рода Draptobacter являются факультативными анаэробами, грамм-отрициательные. Они значительно меньше по размерам своих жертв, и их способ выживания заключается в пробитии клеточной стенки и/или мембраны жертвы и внедрении в цитоплазму. Затем начинается активный синтез ферментов для деградации клетки-хозяина и деление Draptobacter[76].

2.3.2 АНТАГОНИЗМ

Так или иначе все микроорганизмы со сходным типом питания конкурируют между собой за те или иные компоненты питания, поэтому нельзя провести четкую границу между антибиозом и аменсализмом. В ходе этой борьбы у различных микроорганизмов развиваются свои стратегии выживания: одни выживают за счет высокой скорости роста, вытесняя конкурентов, другие благодаря широкому спектру потребляемых субстратов. Отдельно стоит отметить те микроорганизмы, которые начинают синтезировать специфические бактериоцины или ингибиторы роста других микроорганизмов, эта способность позволяет им в одностороннем порядке подавлять рост конкурентов и перейти от конкуренции к аменсализму[62].

Аменсализм – это тип взаимоотношений между микроорганизмами, при которых жизнедеятельность одного организма ингибирует рост другого[5].

Ярким примером Аменсализма является поведение некоторых штаммов S. cerevisiae, способных к синтезу специального токсина, подавляющего рост других дрожжей этого же вида, но безопасного для продуцента[80].

Представители лактобактерий, также подавляют рост конкурирующих микроорганизмов за счет синтеза молочной кислоты[86],[9]. Более того некоторые виды, например Lactobacillus rhamnosus, могут синтезировать еще и бактериоцины[41].

Другим примером химического подавления конкурентов является синтез антибиотиков плесневелыми грибами рода Penicillium или же синтез нистатина (обладающего антигрибковым действием) грамположительными бактериями вида Streptomyces noursei, [40],[17].

2.4 ЗАПАС АДАПТИВНОСТИ/ УСТОЙЧИВОСТИ

Микроорганизмы обладают некоторым внутренним запасом адаптивности. Если клетка попадает в окружающую среду, незначительно отличающуюся от исходной, она начинает приспосабливаться к этим изменениям, без изменений в геноме, а лишь изменяя экспрессию своих генов. Чаще всего это происходит при медленном изменении физико-химических параметров среды в определенном диапазоне.

Например, при изменении температуры бактерия начинает постепенно изменять состав мембраны на более подходящий для новых условий, то есть синтезировать больше насыщенных или, наоборот, ненасыщенных жирных кислот, дополнительно возможен синтез внутриклеточных термопротекторов для ферментов, однако резкого увеличения числа и закрепления новых мутаций в клетке обычно не происходит[9].

Схожий ответ наблюдается при изменении pH среды, когда клетки изменяют состав мембраны с целью снижения её проницаемости, а также начинают синтезировать отрицательно или положительно заряженные молекулы для повышения или, наоборот, снижения кислотности среды[86],[9]. Возможно также активация ионной помпы[46].

Зачастую в среде может изменяться осмотическое давление. Тогда клетки также постепенно меняют состав мембраны для снижения её проницаемости и активируют ряд систем ответа: синтез низкомолекулярных осмопротекторов, таких как амины и некоторые углеводы, а также активный транспорт[35],[64],[79],[86].

Еще одним фактором негативного воздействия может быть присутствие ядов или бактериоцинов, например антибиотиков. Бывают случаи, когда у клеток уже имеется механизм борьбы с этим веществом, например наличие помпы, которая в нормальных условиях задействуется для выведения продуктов собственного метаболизма, но в определенных случаях может также выводить и антибиотики. Другие же организмы могут использовать антибиотики, как компоненты питания и поэтому могут быть к ним устойчивыми[22],[54],[56].

Интересным является и то, что на те или иные стрессовые воздействия клетка часто задействует унифицированные системы ответа. Иногда эти системы могут быть ответственными за несколько стрессовых воздействий, то есть в ответ на кислотный стресс, клетка, например, может приобрести большую устойчивость к окислительному стрессу, при этом устойчивость к осмотическому стрессу или воздействию спиртовых растворов не изменится[74].

2.5 ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Если давящее воздействие имеет большую силу, то зачастую происходит отбор клеток, обладающих полезными мутациями и вымирание менее приспособленных[77],[81],[86],[90].

В целом, эволюция и адаптация бактериального генома происходит по одному из трех механизмов (чаще комбинируя все три):

1) модификация существующих генов путем мутации с вертикальным наследованием

2) приобретение экзогенных генов или кластеров генов бактериями посредством горизонтального переноса генов

3) удаление или распад генов, которые больше не дают преимущества в данной нише[12],[49].

Среди стратегий выживания по степени кооперации можно выделить два вида:

1. приспособление отдельных клеток к условиям окружающей среды

2. их объединение в макроорганизм и дифференциация функций внутри него[71],[101].

2.5.1 ОДИНОЧНОЕ ПРИСПОСОБЛЕНИЕ

В природе постоянно происходят спонтанные мутации, но за счет развитого механизма репарации, большая их часть исправляется до процесса деления клетки. Если же мутация происходит, то возможны три варианта развития: она нейтральна, клетки продолжают расти наравне с остальной популяцией, второе – мутация вредна, тогда клетки, обладающие ей вымирают, и третье – мутация полезна, тогда со временем эти клетки вытеснят не мутантов[63],[77],[81],[90].

Для понимания механизмов приспособления интересно поведение популяций микроорганизмов, которые имеют общего предка и находятся в одинаковых условиях, однако не контактируют между собой (для избежания горизонтального переноса генов и возможного вытеснения одной из популяций). Именно благодаря сравнению таких генотипов можно проследить эволюционную динамику. Так, исследование нескольких популяций E.coli при параллельном культивировании на протяжении более чем 20 000 пересевов на

среде с лимитом по глюкозе показало следующую закономерность: у штаммов произошли изменения в двенадцати генах, ответственных за метаболизм углеводов, причем восемь из них были одинаковыми для всех штаммов, что говорит об общем механизме приспособления для одного вида[97].

Так происходит, например, выработка осмотолерантности, приспособление к повышенным или пониженным температурам, а также присутствию тех или иных веществ: выработка устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам[18],[46],[86]. Данная особенность микроорганизмов широко применяется в биотехнологии и подробнее будет рассмотрена в пункте 7 Роль селекции в микробиологии.

2.5.2 КООПЕРАЦИЯ И МНОГОКЛЕТОЧНОСТЬ

Многоклеточность является одним из механизмов приспособления организмов к окружающей среде.

Котлер и др. изучали динамику формирования многоклеточных образований бактериями. Они выделяли три вида многоклеточных бактерий: филоментные, агрегационные и многоклеточные магнитотактные прокариоты (ММП)[71].

2.5.2.1 ФИЛОМЕНТНЫЕ ФОРМЫ

Филоментные бактерии, соединены в длинные цепи по принципу «конец к концу». Наиболее изученные их представители – это цианобактерии и актиномицеты, также был найден ряд необлигатных филоментных бактерий в других доменах[71]. Бактерии, образующие филоменты, имеют большее количество хромосомных копий, а также образуют в 10-50 раз более длинные клетки, чем их бацилярные сородичи[85].

Механизмы образования филоментов различны: для уропатогенной E. coli это выработка ингибитора клеточного деления SulA, для Mycobacterium tuberculosis это повреждение гена синтеза FtsZ ответственного за деление клетки, для Burkholderia pseudomallei, Shigella flexneri и Salmonella enterica serovar Typhimurium это реакция SOS-ответа на действие антибиотиков. Особняком стоит Proteus mirabilis, который начинает рое- и филоментообразование за счет чувства кворума при накоплении определенного количества клеток (рис. 1. в)[85],[20]. Поскольку большая часть этих микроорганизмов являются патогенами, с которыми активно борется иммунитет макроорганизмов, образование филоментов и последовавшее за

этим укрупнение позволило им эффективнее противостоять фагоцитозу лимфоцитами. Интересным является то, что после того, как патоген переживает фагоцитоз он снова дает одноклеточное потомство, которое заражает новые клетки (удлиненные филоменты не подвержены фагоцитозу после лизиса клетки хозяина, но неспособны к заражению новых, поэтому филоментное поколение сменяется одноклеточным и процесс заражения клеток повторяется) (рис 1а)[85] Другим преимуществом является возможность пережить действие некоторых антибиотиков.

Ряд исследований механизма образования муреина показал следующее: в клетке присутствует два вида муреина – продольный, септальный и полюсный, различающийся по физико-химическим свойствам. И тот и другой Муреин синтезируется из прекурсоров – MfreB (у грамм-положительных бактерий) и Mbl – (у грамотрицательных), а также MreC, MreD (для обоих видов бактерий) с помощью группы специальных пенициллин связывающих белков[12]. Исследование мутаций показало, что пенициллин связывающие белки (ПСБ) 2 и 3 выполняют различные функции при образовании палочковидных форм. ПСБ2 отвечает за продольный синтез клеточной стенки, и при его повреждении стенка перестает удлиняться, а клетка приобретает сферическую форму. ПСБ3 отвечает за синтез полюсного муреина и его выход из строя приводят к образованию длинных несептированных филоментов. Тот же эффект наблюдается у Burkholderia pseudomallei при внесении в среду β-лактамных антибиотиков, связывающихся с ПСБ3 (рис. 1 г)[64],[85].

Образоване флагел является также механизмом защиты некоторых видов Flectobacillus от хищных протистов рода Ochropmonas(см рис.1 б). Интересным также является наличие у этих бактерий сигнальной связи, что подтверждается следующим опытом. Две культуры Flectobacillus культивировали в двух сообщающихся сосудах, разделенных диализной мембраной, затем в один из сосудов внесли хищного протиста. Через какое-то время наблюдалось образование флагел в обоих сосудах, хотя во втором протистов не было[85],[42]. Все причины образования филоментов бактериями приведены на (рис...)

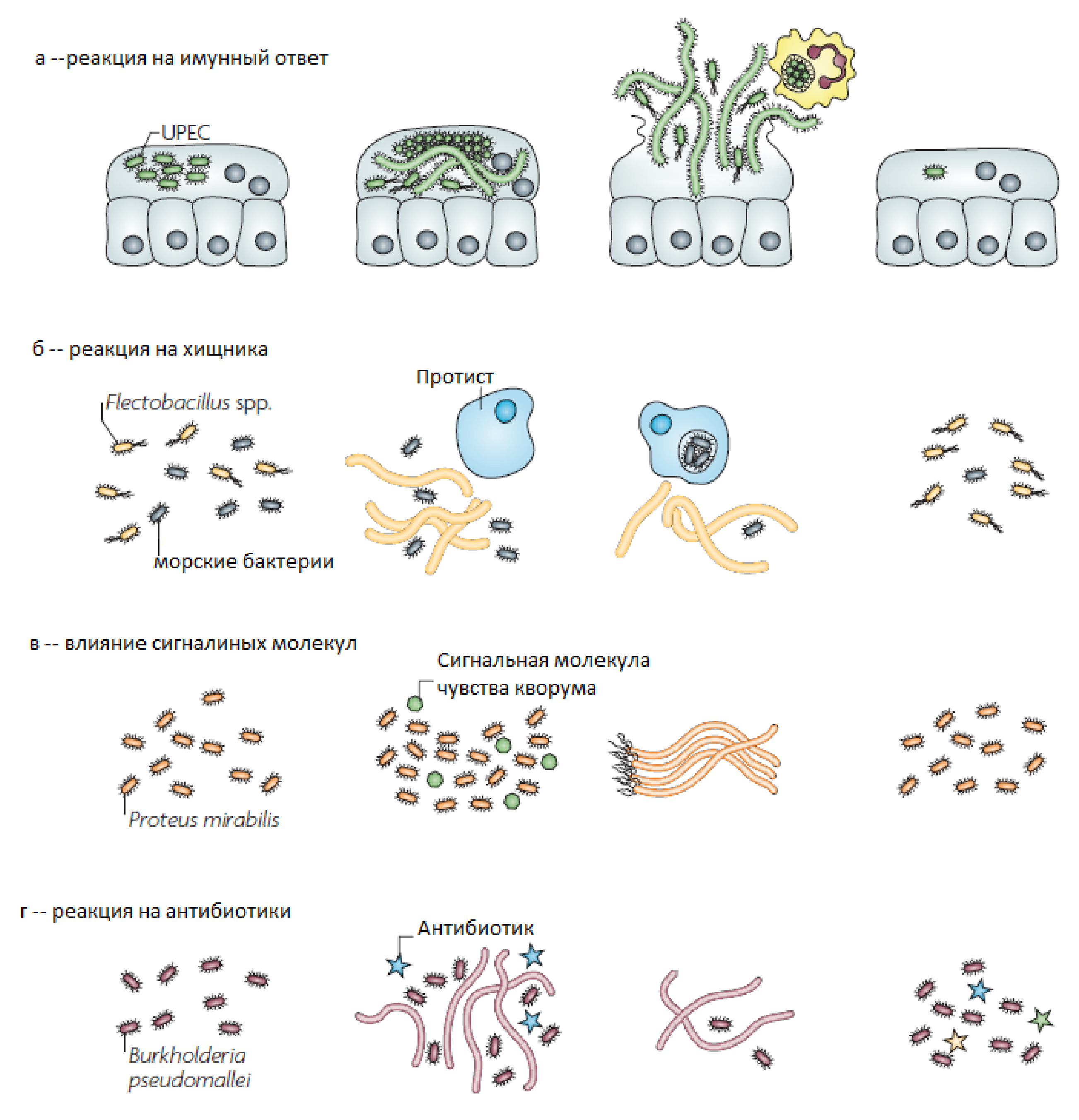


Рисунок 1: Причины образования флагел у некоторых бактерий:

а - урогенитальная E.coli защищается от фагоцитоза лимфоцитом,б - Flecobacillus реагирует на хищного протиста, в -- Proteus mirabilis образует биопленку и флагелы при высокой концентрации сигнальных молекул, г — Burkholderia pseudomallei пережидает высокие концентрации в-лактамных антибиотиков[85]

Среди цианобактерий образовывать флагелы могут представители таких родов как Anabaena, Nostoc, причем среди азотфиксаторов распространена также дифференциация функций: часть клеток специализируется на ассимиляции молекулярного азота, поэтому имеет особое строение для предотвращения попадания кислорода внутрь, остальная часть клеток выполняет энергетическую функцию, снабжая клетки-азотфиксатры питательными веществами[34].

Особый интерес вызывают цианобактерии рода Desulfobulbaceae. Его представители являются хемолитотрофами, окисляющими сульфиды до сульфатов. Они обитают в донных слоях воды около минеральных осадков. Из-за высокой концентрации сульфидов в донных слоях, там создаются анаэробные условия, которые препятствуют их метаболизму. В ходе процесса эволюции данные цианобактерии стали образовывать длинное тонки флагелы (около 200нм в диаметре), которые могут протягиваться на несколько сантиметров(см. рис. 2). Нижние концы флагелл находятся в богатой сульфидом среде, большая центральная часть находится в среде, где нет кислорода, а концентрация сульфида невысока, верхняя же их часть достигает кислород-содержащих слоев. Таким образом, флагеллы, состоящие из нескольких тысяч клеток, играют роль проводов для переноса электронов в процессе окисления минералов[38].

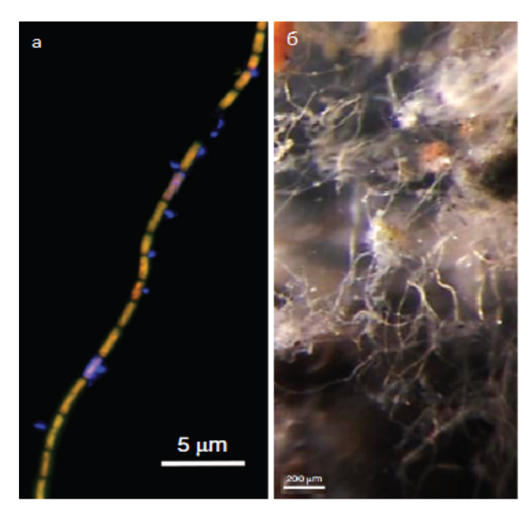


Рисунок 2: филоменты Desulfobulbaceae отрезок равен 5 и 200 мкм соответственно[38].

Филоменты могут быть как линейными, так и ветвящимися, однослойными или многослойными. Ярким примером ветвящихся филоментов являются цианобактерии Fischerella muscicola[34]. Поскольку площадь свободной поверхности каждой отдельной клетки практически не изменилась, то и затруднений в транспорте питательных веществ не наблюдается. Филоментные бактерии были первыми многоклеточными организмами на Земле и появились более трех миллиардов лет назад, а также были первыми у кого обнаружили дифференциацию клеток по функциям[71].

2.5.2.2 БИОПЛЕНКИ И РОИ

Агрегационные бактерии образуют пленки или роящиеся образования. Данная группа сложно отделима от первой (в пленках и в «роях» встречается филоментный тип соединения клеток). Формирование биопленок бактериями активно изучалось в последние десятилетия. Известно, что для пленко- и роеобразования требуется развитый каскад сигнальных и регуляторных молекул, которые регулируют морфологию и тип клеток. Однако помимо регуляторных и сигнальных молекул поведение пленки может регулироваться и другими физико-химическими параметрами среды, например накоплением вторичного метаболита или внесение предингибирующей концентрации антибиотика[13],[28].

Среди образующих биопленки бактерий наиболее изученными являются представители B. subtilis. Цикл развития их биопленки следующий: сначала подвижные клетки попадают в благоприятные условия, затем они прикрепляются к поверхности (или границе раздела фаз), после чего они теряют подвижность и происходит дифференциация на активно делящиеся клетки и клетки, которые занимаются синтезом экзополисахаридов матрикса. Для поддержания и управления такой сложной кооперацией у B. subtilis имеется развитая сигнальная система (будет рассмотрена подробнее ниже см раздел 5 чувство кворума)[71],[89],[28].

Proteus mirabilis относится также и к роящемуся типу, однако было замечено, что формирование роя происходит посредством наложения большого количества флагел друг на друга, и штаммы с поврежденными генами, ответственными за их образование хуже роились[20].

Некоторые другие виды, например Myxococcus xanthus, помимо образования бипленок имеют также дифференциацию клеток по функциям – в культуре образуются грибоподобные структуры, выполняющие только функцию спорообразования, подобно плодовому телу грибов[16].

Зачастую, помимо адгезионной связи между собой клетки в составе роя или биопленки окружены матриксом, состоящим из полисахаридов, белков и нуклеиновых кислот. Так матрикс S. aureus включает в состав N-ацетил глюкозамин и ряд специфических белков, B.subtilis – амилопротеин TasA, поли-δ-глутамат, а также полисахарид на основе глюкозы, P. aeroginisa – ряд нуклеиновых кислот[28]. Иногда клетки в рое могут быть связаны флагеллами. Будучи не клональными колониями, а агрегирующими клетками они имеют ряд трудностей в совместном существовании с «соседом», с другой стороны, такая популяция обладает значительным генетическим разнообразием, что является весомым преимуществом[71],[85],[89].

2.5.2.3 МНОГОКЛЕТОЧНЫЕ МАГНИТОТАКТНЫЕ ПРОКАРИОТЫ

Многоклеточные магнитотактные прокариоты (ММП) являются наименее изученным и наименее представленным в природе видом, они также являются единственными облигатными многоклеточными бактериями. ММП имеют отрицательную окраску по Граму, относятся к дельта-протобактериям, образуют микроколонии 5-10 мкм в диаметре состоящие из 20-60 клеток (по другим данным 10 – 40 клеток[23]). Клетки имеют тетраэдрическую форму и соединяются узкой частью внутрь в однослойные пустотелые шарообразные колонии по средствам флагелл. Электронная микроскопия показала сходство их плотной упаковки с клетками животного эпителия, а форма колоний напоминает водоросли Volvocaceae (см. рис.3)[71],[29].

Размножение происходит путем синхронного деления клеток всей колонии без стадии одноклеточности: шарообразная колония сначала удлиняется до состояния элипса, а затем делится на две меньших в диаметре сферичесих колонии. При этом диаметр колонии растет вместе с размером клетки, в то время как количество их в колонии сохраняется (в зависимости от подвида количество клеток в колониях может отличаться). Механизм регуляции синхронности в настоящее время неизвестен (см. рис. 4)[68].

Также стоит отметить возможность этого микроорганизма перемещаться за счет скоординированного движения флагел всей колонии, скорость его движения может достигать 90 мкм/с. ММП способны ориентироваться по магнитному полю Земли, для этого в клетках присутствует специальная органелла – магнитосома, содержащая в своем составе кристаллы магнетита и сульфида железа[23].

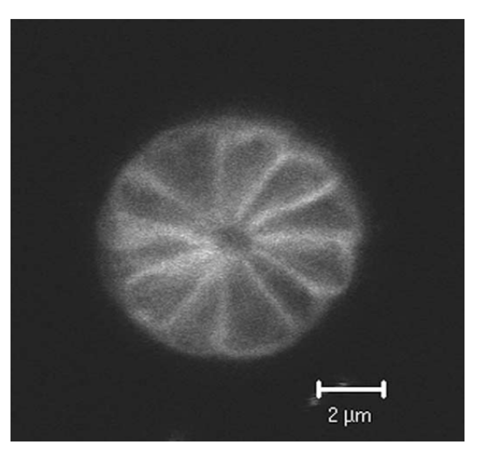


Рисунок 3: лазерная сканирующая микроскопия магнитотктного многоклеточного прокариота с липофильным флуорисцентным красителем FM 1-43 [68].

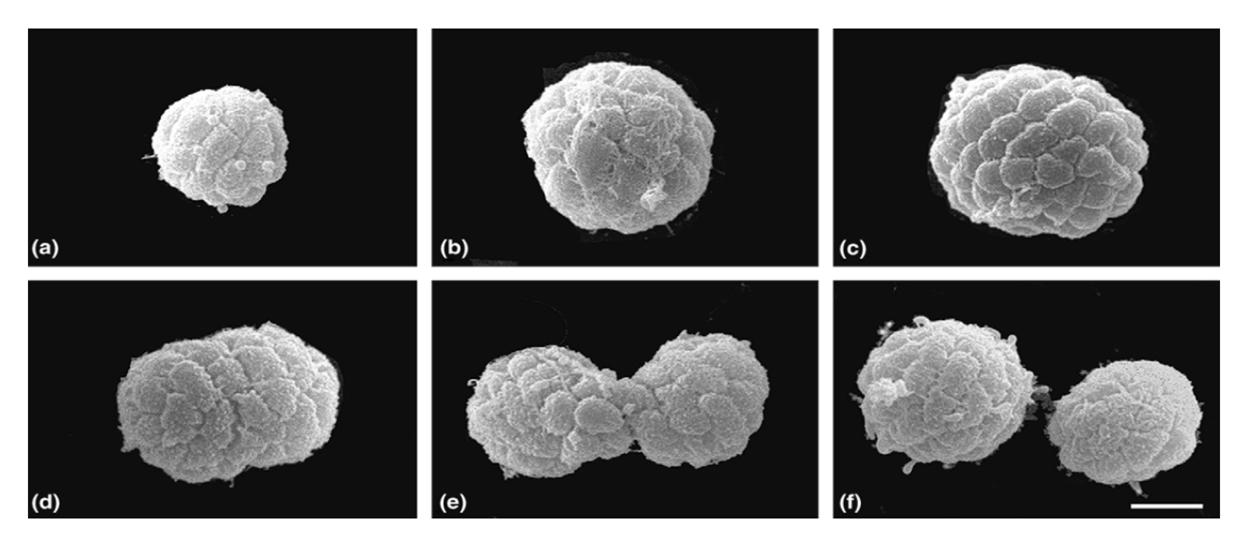


Рисунок 4: Сканирующая электронная микроскопия жизненного цикла магнитотактных многоклеточных прокариотов.

a - изначальное состояние маленький сферический организм. b -- происходит увеличение размера клеток, но не их числа c - клетки начинают синхронно делиться внутри одного большого организма d - организм начинает удлиняться перед делением e -деление практически завершается это уже два связзанных между собой организма f - деление заканчивается появлением двух равных организмов размер отметки 4 мкм[68].

Этот организм обитает в сильно соленых озерах или морях. Интересным является то, что при добавлении дистиллированной воды, раствора ПАВ или разбавленного раствора протеаз колония распадается на составляющие её клетки, которые не могут ни двигаться ни делиться, делая эти организмы единственным примером «безодноклеточных» бактерий[68].

2.5.3 ПРЕИМУЩЕСТВАИ НЕДОСТАТКИ МНОГОКЛЕТОЧНОСТИ

2.5.3.1 ПРЕИМУЩЕСТВА МНОГОКЛЕТОЧНОСТИ

Агрегация повышает стойкость к таким воздействиям как, перепады температуры, осмотический шок, значительное изменение pH, окислительный стресс, высушивание, отравление тяжелыми металлами и механическое воздействие. Позволяет переживать высокие концентрации антибиотиков в среде, эффективно противостоять хищникам, дает конкурентное преимущество в межмикробных конфликтах, обеспечивает более полное потребление субстратов и рост при более низких его концентрациях[71].[101].

Целый ряд преимуществ обусловлен не столько наличием и строением внешнеклеточного матрикса, сколько координированными действиями всех клеток колонии, иногда это заключается в дифференциации клеток и более эффективном исполнении ими своих функций, а иногда в программируемой смерти некоторых клеток колонии как для спорообразования и формирования более развитой площади поверхности так и для создания живой изгороди для защиты небольшого числа клеток в центре колонии[52],[93],[101].

2.5.3.2 НЕДОСТАТКИ МНОГОКЛЕТОЧНОСТИ

С другой стороны, объединение клеток в макрорганизм имеет и ряд недостатков.

Существование группой, в отличие от одноклеточного существования требует, например дополнительную трату энергии на адгезию и синтез сигнальных молекул. Некоторые виды при переходе к многоклеточному состоянию утрачивают подвижность. Также возмонжо возникновение «трутней» внутри колонии, что также негативно скажется на энергоэффективности[71],[93].

Зачастую развитие бактерий внутри многоклеточных образований происходит медленнее, чем одноклеточных особей. Так в ходе селекции многоклеточных дрожжей было обнаружено, что прирост биомассы в кластере происходит на 10% медленнее, чем для свободно живущих клеток, то есть при отсутствии давящего отбора на смешанную культуру одноклеточная форма постепенно вытеснит многоклеточную[101].

2.6 ЧУВСТВО КВОРУМА И МЕХАНИЗМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ МНОГОКЛЕТОЧНОСТИ

В ходе эволюции многие организмы приобрели возможность коммуникации внутри вида или даже с некоторыми другими видами-симбионтами. Несмотря на кажущееся их разнообразие, чувство кворума у разных микроорганизмов, регулируется с помощью следующих механизмов: сигнальными молекулами (такими как ц-ДГМФ или D-аминокислоты), сигнальными киназами, и фосфат-связывающими доменами, образованием трансмембранного адгезионного потенциала[66],[71].

Механизм этой коммуникации является общим для большинства микроорганизмов. Схема состоит из двух обязательный компонентов: аутоиндуктора и рецепторного регуляторного белка.

Аутоинудктор представляет собой низкомолекулярное соединение, играющее роль регулятора, который синтезируется всеми или только некоторыми клетками популяции и выделяется в среду. За счет маленького размера молекулы он легко проникает в клетку посредством диффузии. Когда его концентрация в клетке станет достаточной он взаимодействует со специфическим регуляторным белком и запускает тот или иной процесс.

Так как концентрация его в среде примерно одинакова, он легко диффундирует и его пороговая концентрация для его взаимодействия с рецептором внутри клетки тоже одинакова, это обеспечивает практически одновременный ответ всей колонии или сообщества[7],[82].

Кооперации клеток обладают механизмом стабилизации генома популяции от значительных мутаций: при повреждении ДНК в одной из клеток соседние клетки вырабатывают ингибиторы ДНК-полимеразы, такие как FtsZ для предотвращения наследования дочерними клетками поврежденной ДНК[85],[20].

Еще одним интересным механизмом, позволяющим клеткам объединяться является система «родовой дискриминации» (для объединения недочерних клеток), которая ставит цели макроорганизма выше целей отдельных клеток и предотвращает конфликты между ними: клетки отличающиеся по определенному критерию уничтожаются остальной популяцией[57]. Ранее считалось, что объединение и взаимодействие может происходить только у клеток с одинаковым геномом, но для Myxococcus xanthus, в частности, достаточно идентичность всего одной аллели TraA[16],[75],[92].

B. subtilis, например, в ходе развития внутри биопленки выделяет ряд сигнальных молекул, по концентрации которых в среде они определяют стадию развития и координируют дальнейшие действия. В более старых уже сформированных пленках, которые не так активно делятся происходит постепенная споруляция клеток, которые до этого занимались строительством и поддержанием внешнего матрикса. Для того чтобы подвижные споры могли покинуть матрикс часть клеток выделяют ряд D-аминокислот (D-лейцин, D-тирозин, D-триптофан) или коротких пептидов, содержащих менее 10 аминокислотынх остатков. Эти соединения являются сигнальными молекулами, которые ингибируют образование матрикса на этом участке[71],[89],[93]. Причем сигнальные молекулы, выделяемые популяцией могут сильно различаться даже среди штаммов одного вида[28]. Отдельно стоит отметить, что вместе с генами, ответственными за синтез компонентов матрикса, экспрессируется также несколько генов синтеза токсинов, и параллельно происходит активация механизмов защиты от них. У клеток, которые занимаются делением этого не происходит и они сильнее подвержены его воздействию. То есть, по ходу развития популяции количество делящихся клеток остается примерно на одном уровне, в то время как «клеток-строителей» становится больше[89].

Стоит также упомянуть плёнкообразующих представителей вида Candida abicans, которые используют в качестве сигнальных молекул активные формы кислорода, что является весьма редким явлением для прокариотов[67].

Некоторые исследователи считают, что клетки могут реагировать не только на концентрацию каких-либо сигнальных молекул в среде, но также на изменение её физических свойств из-за накопления биомассы, например вязкости или давления[8].

Даже для клеток, которые не образуют многоклеточные структуры характерна обратная связь между скоростью роста и состоянием популяции. Так, при культивировании E.coli размеры клеток были постоянны на протяжении экспоненциальной фазы, но были заметны определенные отличия в популяции: активно делящиеся клетки были толще, чем клетки, пребывающие в стационаре[64].

В ходе эволюционного эксперимента над дрожжами вида S. cerevisiae по выделению многоклеточных форм был обнаружен апоптоз. Многоклеточные формы дрожжей образовывали кластеры неправильной формы. Скорость прироста биомассы в кластерах лимитировалась его размерами (чем он больше, тем медленнее рост). Для преодоления этого барьера кластеры были вынуждены периодически делиться. Процесс деления заключался в следующем: во-первых, рост происходил по определенной архитектуре, кластер состоял из центрального звена и нескольких дочерних отростков, соединенных с родительским по средством слабых связей (тонкой цепочки из небольшого числа клеток), во-вторых, когда дочерние кластеры достигали определенных размеров, происходил апоптоз клеток «слабых связей» и дочерний кластер отрывался от родительского, однако молекулярный механизм остается неизвестным (см. рисунок 5)[101]. Другие исследования показывают, что сигнальными молекулами для запуска программируемой смерти у дрожжей являются активные формы кислорода[67].

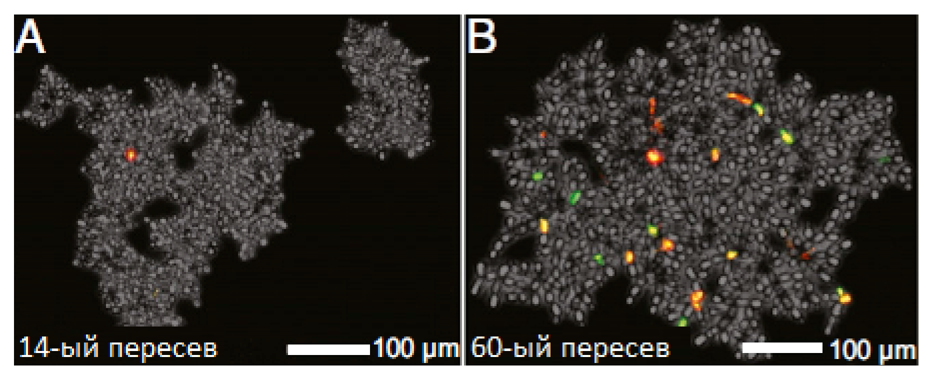


Рисунок 5: Размеры кластеров на разных этапах селекции. цветами указаны клетки на разных стадиях апоптоза зеленый -- начало, желтый -- активная стадия, красный -- только что лизировавшиеся[101].

2.7 РОЛЬ СЕЛЕКЦИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Селекция позволяет отбирать полезные для условий среды фенотипические признаки штаммов, делая приспособленные особи доминантными. Более того последующий анализ генома селекционированных штаммов и его сравнение с геномом исходного, поможет определить гены, ответственные за приспособляемость и в будущем использовать эти данные в генной инженерии[86].

Для ускорения природных процессов в лабораториях часто используются мутагены. Так в опытах над E.coli, оказалось, что при мутационным выключением гена RodA, ответственного за строение клеточной стенки, происходило повышение осмотолерантности, за счет снижения проницаемости мембраны, а также изменение формы клеток с палочковидных на кокковидные[64].

Часто проводится селекция случайных мутантов в популяции без добавления мутагенов. Так за год селекции в условиях постепенного снижения pH был получен ацидофильный штамм пробиотических бактерий вида Leuconostoc mesentericus. Селекционный штамм в кислых условиях экспрессировал другие гены, которые, однако, присутствовали и в исходном штамме. Единственным генотипическим отличием стал сдвиг рамки считывания в гене, кодирующем ε-субъединицу АТФазы[86].

Эксперименты по повышению кислотоустойчивости Bifidobacterium longum путем селекции при ступенчатом снижении pH позволили получить штамм, сохраняющий жизнеспособность при pH=2,5. Также стоит отметить, что при многократных пересевах при нормальном pH этот признак не отсеялся, что говорит о селекции, как важном инструменте создания штаммов с заданными свойствами. Интересным отличием селекционного штамма от исходного стало уменьшение на 40% количества экзополисахаридов в капсулы и его склонность к адгезии и оседанию. Это явление не похоже на поведение других микроорганизмов, которые наоборот стараются увеличить барьер между клеткой и агрессивной средой, наращивая капсулу. То есть каждый вид самостоятельно выбирает для себя стратегии выживания. Стоит также отметить, что в условиях низкого pH при искусственном внесении экзополисахаридов исходного штамма в культуру с селекционным штаммом, его кислотоустойчивость падала и он погибал[33].

Иногда селекция позволяет получить неожиданные дополнительные свойства микроорганизмов. Например, при попытке повысить устойчивость к окислительному стрессу у культуры Lactobacillus casei посредством добавления цитохрома bd и активной аэрации обнаружилась следующее: для селекционного штамма ингибирующая концентрация пероксида водорода была в четыре раза выше, чем для исходного, также неожиданно обнаружилась повышенная выживаемость при дефростации, более короткая лаг-фаза и большая удельная скорость роста. С другой стороны внесение цитохромов имело и негативный эффект: выход молочной кислоты упал за счет активации другого метаболического пути, переводящего пируват в ацетат[46].

Для получения штаммов с заданными свойствами важно правильно выбрать давящее воздействие, а также стратегии его поэтапного увеличения. Так, для выработки антибиотикорезистентности у пробиотических штаммов каждые 200 пересевов происходило удвоение концентрации антибиотиков в среде[39].

Для селекции многоклеточных образований, наиболее простым и действенным является гравитационный отбор, когда агрегированные клетки оседают, в то время как одноклеточные формы остаются во взвешенном состоянии. Также возможна его интенсификация с применением центрифуги. Так за всего за 60 пересевов с использованием центрифуги удалось выделить оседающие хлопьевидные агрегаты дрожжей S.cerevisiae, отличающихся от исходных рядом генов. При выделении их чистой культуры и её последующих пересевов без давящего отбора не наблюдалась потеря многоклеточности, что также говорит действенности процесса селекции для получения устойчивых признаков в популяции (рис. 6)[101].



Рисунок 6: цикл развития кластера[101]

Интересны также результаты другого исследования многоклеточных дрожжей: было определено, что дрожжи, растущие в кластере потребляли субстрат более полно и продолжали делиться при вдвое-вчетверо меньших концентрациях, чем одноклеточные формы. Вероятным объяснением является то, что продукты метаболизма внешних дрожжей утилизировались внутренними клетками, а не выводились в среду по градиенту концентрации[52].

Другим возможным способом отбора многоклеточных организмов является применение хищных микроорганизмов как давящего фактора отбора. Одной из возможных причин объединения является защита от хищников: при превышении определенных размеров колония становится недоступна для фагоцитоза, в отличие от одноклеточных представителей, таким образом, постепенно признак многоклеточности закрепляется[101],[85],[42].

2.8 МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА, ЕЁ ПРОДУЦЕНТЫ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ТРУДНОСТИ

Молочная кислота (2-гидроксипропановая) признана абсолютно безопасной Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов и широко используется в пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве и косметологии. Также за рубежом началось активное использование её в качестве сырья для производства биоразлагаемого пластика, на основе полилактида (рис. 7). Одним из основных продуцентов являются бактерии родов Lactobacillus Lactococcus и Leuconostoc. При этом последние используются для производства не пищевой D-молочной кислоты[86],[4].

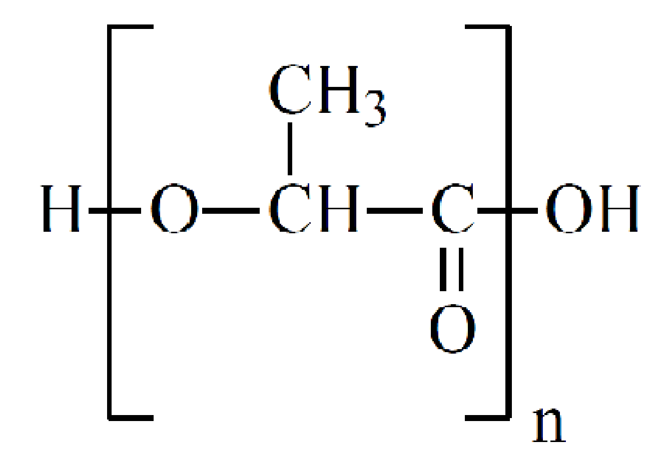


Рисунок 7: Структурная формула полилактида [4]

Одной из наиболее приоритетных задач производства является получение штаммов с большей устойчивостью к высоким концентрациям молочной кислоты в среде. Другим важным направлением является улучшение технологических аспектов производства, таких как подбор субстратов, а также более совершенных способов отделения биомассы и выделения кислоты из среды. Существенную роль в решении этих задач играет селекция штаммов, которая позволяет закреплять в популяции необходимые признаки. Стоит отметить, что селекционные штаммы имеют обычно более устойчивые мутации, чем штаммы, полученные генноинженерными способами и не требуют специфических сред[39],[86],[33].

2.8.1 ЛАКТОБАКТЕРИИ

Род Lactobacillus насчитывает более 177 видов микроорганизмов и является самым многочисленным семейством среди лактобактерий[12].

Молочнокислые бактерии являются грамположительными, не спорообразующими микроорганизмами. Облигатные бродильщики, главным продуктом которых является молочная кислота. Они способны к катаболизму широкого спектра углеводов, включая лактозу, аэротолерантны[12].

Лактобактерии имеют широкое экологическое распространение: их представители были выделены из кисломолочных продуктов, вина, сыра, силоса более того, они являются комменсалами или, чаще, симбионтами большого числа позвоночных, в то же самое время являются антагонистами огромного количества микроорганизмов[3],[12],[27].

Их широкое распространение обусловлено гибкостью метаболизма, которая в свою очередь, объясняется вариабельностью их генома. Такая изменчивость генома коррелирует супрагеномной гипотезой, которая говорит, что все представители некоторых семейств носят различные части общего генома, значительно большего, чем геном любого из видов. При попадании нового организма в экологическую нишу, близкие ему по роду организмы «делятся» с ним полезными в данной экологической нише генами посредством горизонтального переноса генов[12],[39],[41],[49].

2.8.2 ЗАПАС АДАПТИВНОСТИ

Лактобактерии, как и другие микроорганизмы имеют некоторый внутренний запас адаптивности. Геном клеток содержит огромное количество генов, часть из которых экспрессируются постоянно, экспрессия других активируется определенными внешними условиями. Наиболее частыми изменениями окружающей среды является температура, pH, осмотическое давление, а также присутствие специфических соединений[12][86],[9],[46],[35].

Поскольку для лактобактерий наиболее частым кислотно-основным стрессом является закисление среды продуктами их жизнедеятельности, то их системы ответа расчитаны на защелачивание цитоплазмы: так представители рода Lactobacillus активизируют аргинин дезаминазную и глутамат декарбоксилазную активность для выделения ионов аммония и первичных аминов. Обитание в кислых условиях является одной из главных причин отсутствия системы ответа на щелочные условия и, как следствие, практически полного ингибирования роста молочнокислых бактерий при pH выше 7[86]. Другие микроорганизмы для поддержания внутриклеточного pH постоянным, могут резко активизировать ионные помпы[46]. Некоторые представители L.casei при постепенном изменении pH меняют состав мембраны[9].

Ввиду того, что молочная кислота является слабой, помимо повреждения мембраны клетки с внешней стороны и её перфорации при высоких концентрациях возможен также следующий механизм: концентрация кислоты в среде возрастает, и часть недиссоцированной кислоты (менее неполярные молекулы, чем ионы) проникает внутрь клетки диффузией через мембрану. Внутри клетки концентрация кислоты не так велика и молекула диссоциирует, снижая внутриклеточный pH и приводя к депуринизации ДНК и повреждению мембраны клетки, денатурации белков и инактивации ферментов, Так, например у E. coli при культивировании на среде содержащей 8мМ кислоты наблюдалось накопление гомосерина и снижение количества метионина на 80% из-за блокировки некоторых ферментов его биосинтеза[86].

Механизм защиты от данного воздействия также частично перекрывает общий ответ на снижение pH (глутамат декарбоксилазную и аргинин дезаминазную), однако некоторые виды имеют дополнительные системы защиты. Так некоторые штаммы L. plantarum могут изменять состав мембраны и соотношение некоторых катаболических путей, снижая выделение кислоты в среду или задействуя более кислотоустойчивые ферменты[74].

На повышение осмотического давления большинство лактобактерий активирует синтез низкомолекулярных соединений для поддержания тургурного давления внутри клетки, например, четвертичных аминов, самым распространенным из которых является N,N,N-триметилглицин (бетаина). Бетаин является легкорастворимым соединением, ввиду полярности молекулы, также он относительно инертен. Хотя все представители лактобактерий потенциально способны к его накоплению, большинство видов делает это в небольших количествах. Так представители L.bulgaricus ATCC 8144 выдерживали только концентрацию солей, равную 0,3 М, а L. delbrueckii ATCC 9649 – 0,6 М.Тем самым большая часть представителей рода Lacobacillus обладают низкой толерантностью. Отдельно можно выделить штамм L.acidophilus 3532, который за счет колоссального накопления бетаина в клетках, способен без изменений расти при концентрациях ацетата натрия или хлоридов натрия и калия равных 1 М или в растворах неэлектролитов до 3 М (фруктоза или сорбитол). При концентрации солей, равной 1,8 М также наблюдался рост, но оптическая плотность была примерно вдвое меньше контроля [79].

Отдельно стоит отметить комплексность некоторых систем ответа на стрессовые воздействия. Так, например, L.plantarum ZDY2013 при резком снижении pH активирует комплексную систему ответа, которая помимо защиты от кислотного стресса также существенно повышает устойчивость к окислительному, однако не оказывает значимого эффекта на устойчивость к тепловому шоку, осмотическому давлению, обработке спиртом или желчными кислотами[74].

Лактобактерии также иногда используют некоторые компоненты среды, которые они не в состоянии синтезировать для защиты от тех или иных стрессовых воздействий. Так при внесении в среду цитохромов bd, (участвующих в дыхательной цепи, которая отсутствует у лактобактерий) у штамма Lactobacillus casei N87 в четыре раза увеличилась выживаемость при оксилительном стрессе пероксидом водорода, менадионом и пиррогалолом. Также наблюдалось перекрестное увеличение устойчивости к дефростации относительно контроля[46].

2.8.3 ГРУППА L.CASEI И ИХ ГЕНОТИП

Различные виды L.casei, L.paracasei и L.rhamnosus филогенетический и фенотипически похожие и их обычно рассматривают как одну группу Lactobacillus casei, включая факультативных гетероферментативных молочнокислых бактерий. Их геном содержит около 3 ± 0,1 миллионов пар оснований (рис. 8)[41].

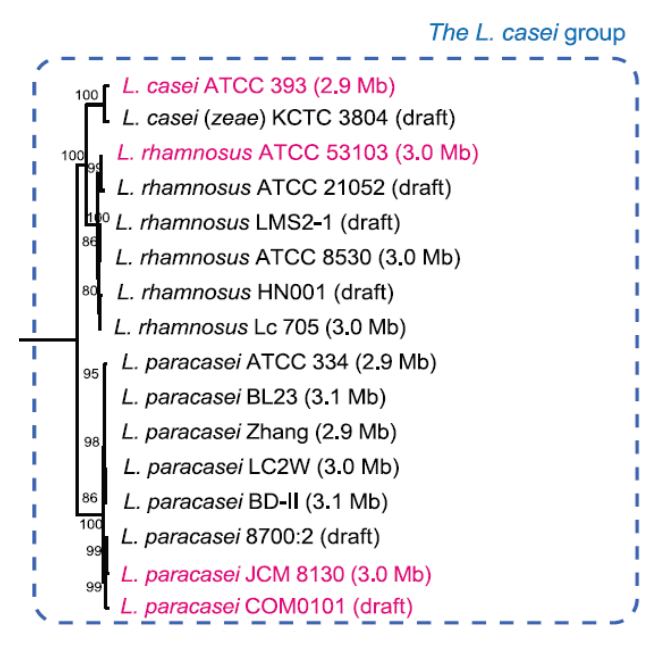


Рисунок 8: Филогенетическое дерево представителей группы L.casei на основе сравнения 16 S РНК [41].

Стоит, однако, отметить, что при сравнении близкородственных микроорганизмов целесообразнее использовать протеомный и генетический анализы, так как они являются менее консервативными, чем анализ 16s РНК[10],[59].

Внутри группы штаммы обладают большим сходством геномов, причем виды rhamnosus и casei являются более родственными между собой, чем с paracasei (рис.9)[41].

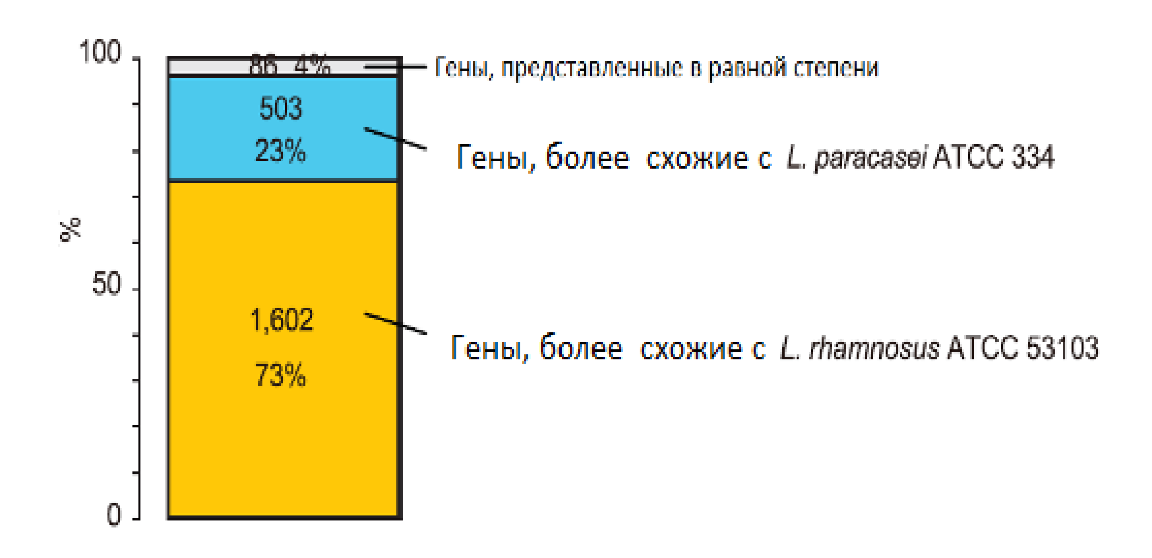


Рисунок 9: Сравнение сходства геном L. paracasei и L.rhamnosus с L. casei[41].

Также, при сравнении геномов 4 представителей группы casei, было обнаружено, что количество общих генов для всех 4 штаммов было больше, чем всех не совпадающих, хотя бы с одним представителем. (рис. 10)[41].

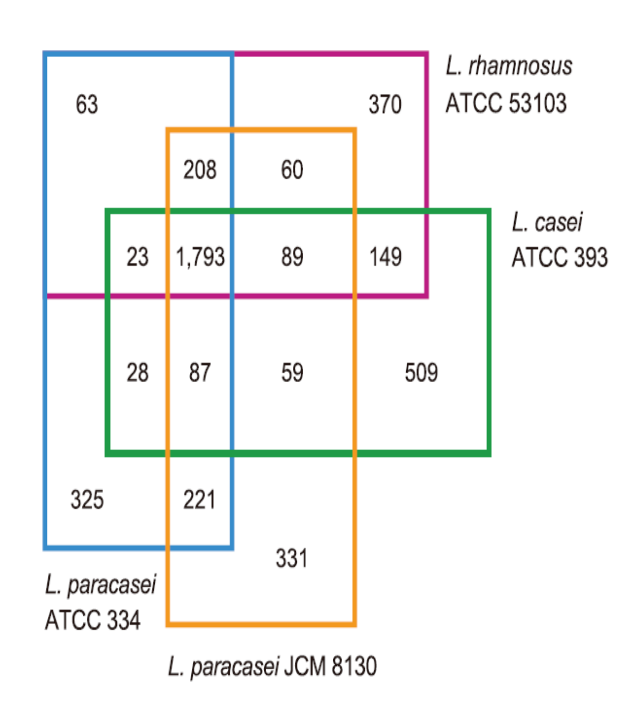


Рисунок 10: Диаграмма Венна геномов четырех представителей группы casei [41]

Помимо использования представителей рода Lactobacillus в промышленности в настоящее время многие штаммы L.paracasei, L.casei и L.rhamnosus активно применяются при производстве пробиотических продуктов[41],[39].

Иная экологическая ниша требует от пробиотических штаммов более широкой субстратной специфичности, возможности противостоять низкому pH желудка, способности к адгезии к клеткам эпителия кишечника, существенным преимуществом также является возможность синтеза антимикробных веществ для подавления конкурентов и устойчивость к применяемым в медицине антибиотикам[9],[12],[39],[74].

Ярким примером различных механизмов адаптации представителей группы casei является сравнение генома пробиотического штамма L. rhamnosus ATCC 53103 и промышленного L. paracasei ATCC 334, используемого при производстве сыра.

Ввиду того, что штаммы принадлежат разным видам, их сравнение проводилось не по строению генов, а функциям, которые они выполняют. Так по COG классификации (Clusters of Orthologous Groups – кластеров групп ортологических генов) пробиотический штамм имеет больше генов группы G, ответственных за метаболизм углеводов, что обусловлено большим разнообразием углеводных субстратов в нише его обитания, в то время как в молоке наблюдается маленькое разнообразие углеводов. С другой стороны промышленный штамм обладал большим количеством генов различных протеаз, что также говорит о его приспособлении к полному использованию субстрата своей ниши. Отдельно стоит отметить, что L. rhamnosus ATCC 53103 обладает едва ли не самым большим спектром потребляемых углеводов среди пробиотических штаммов (рис. 11)[41].

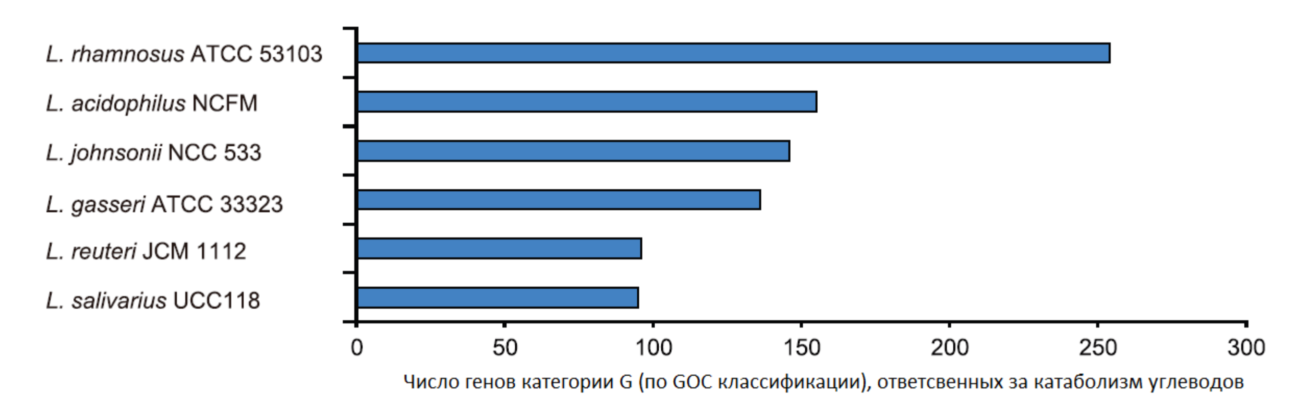


Рисунок 11: Сравнение числа генов, ответственных за катаболизм углеводов среди пробиотических культур [41].

Помимо различий в генах, отвечающих за метаболизм, у пробиотического штамма наблюдалась практически неразвитые CRISPR, что обусловлено практически полным отсутствием вирусов бактерий в среде, в отличие от промышленного штамма[12].

Наконец, для получения конкурентного преимущества среди огромного разнообразия микробиоты кишечника, L. rhamnosus ATCC 53103, значительно развил способность синтезировать бактериоцины, в то время как L. paracasei ATCC 334 подавляет конкурентов преимущественно за счет молочной кислоты[41].

Важно также упомянуть, что среди пробиотических культур лактобацилл широко распространен горизонтальный перенос генов, который значительно упрощает их адаптацию.

2.8.4 МНОГОКЛЕТОЧНОСТЬ И АГРЕГАЦИЯ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

В некоторых стрессовых условиях, таких как снижение pH, повышение температуры или внесение окислителя (периодата натрия) среди нескольких видов пробиотических лактобацилл наблюдается агрегация, однако данный эффект кратковременный: при продолжении стрессового воздействия культура погибает, при его прекращении дочерние клетки будут снова в свободном состоянии. Ввиду краткосрочности их агрегации никакой дифференцировки или совместного деления, которые наблюдались у некоторых агрегирующих микроорганизмов, выявлено не было[43],[71],[101].

Также стоит отметить, что пробиотические организмы имеют хорошую адгезию к клеткам эпителия кишечника, покрывая его тонким слоем. Это обусловлено целым рядом специфических белков, которые соединяют их с клетками хозяина[9]. Однако из-за особенностей их экологической ниши, образование крупных агрегатов между собой увеличит их выведение из организма, что сделает их менее конкурентоспособными, поэтому искать многоклеточные образования лактобацилл целесообразнее среди промышленных штаммов[10].

При определенных допущениях, таким многоклеточным агрегатом лактобактерий можно считать кефирные зерна, которые будут рассмотрены в пенкте 8, однако, учитывая то, что они содержат не только лактобактерии но и другие микроорганизмы, правильнее будет считать их сообществом[98],[37],[7].

Эволюция и адаптация бактериального генома мысль возникает через три основных процесса:

1. модификация существующих генов путем мутации с вертикальным наследованием [9-12];
2. приобретение экзогенных генов или кластеров генов бактериями посредством горизонтального переноса генов (HGT),13-17];
3. удаление или распад определенных генов, которые больше не дают конкурентного-преимущество в данных условиях.

2.9 СООБЩЕСТВО КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ

Кефирные грибки представляют собой сложное сообщество различных видов микроорганизмов, включая лактобактерий, уксусно-кислых бактерий, дрожжей и филоментных грибов, заключенных в полисахаридную матрицу. Зерна кефирных грибков представляют собой небольшие упругие гранулы кремового оттенка белого или желтоватого цветов. Гранулы овальной или неправильный формы, даже после промывания сохраняют вязкую слизистую оболочку (рис. 12). Они представляют собой пористые тела, с включенным в них каркасом из филоментов грибов.[98],[37]. Имеют несильный специфический вкус. Параллельно с приростом биомассы осуществляется и прирост матрицы сообщества, с удельной скоростью примерно 0,04 – 0,1 сут$^{-1}$, при культивировании ни молоке[7].

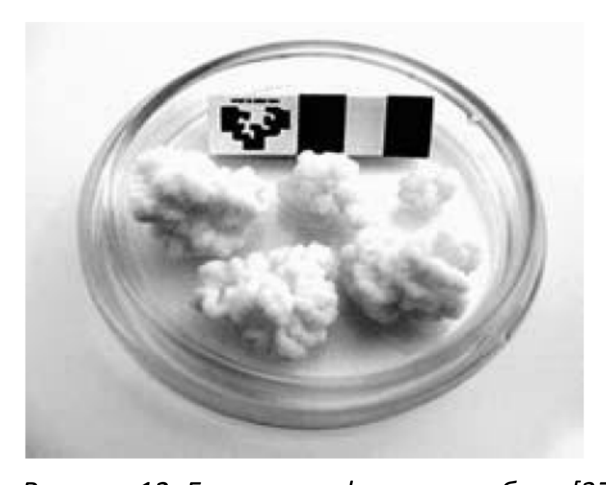


Рисунок 12: Гранулы кефирных грибков [37]

2.9.1 ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ

Кефирные грибки на 80-90% состоят из воды. Микрофлора кефирных грибков составляет около 0,9% от сухого веса всего грибка, остальная массам приходится на матрицу[7]. Матрица кефирных состоит из полисахаридов, преимущественно кефирана (около 24-25% сухого веса), а также белков и некоторых неидентифицированных соединений[98]. Белки, входящие в состав гранул имеют больший молекулярный вес, чем белки молока, что говорит об их синтезе микроорганизмами, а не образовании путем частичного нидролиза белков среды[7].

Кефиран представляет собой разветвленный полисахарид, состоящий из примерно равного количества глюкозы и галактозы (рис. 13). При использовании β-D-(1 – 6) глюканазы Trihoderma viride он гидролизуется до глюкозы и кефирозы (пентасахарида, состоящего из остатков галактозы, связанных β-D-(1 – 2, 1 – 3 и 1 – 4) гликозидными связями[55],[58].

Рисунок 13: Структурная формула кефирана [58]

Молярная масса кефирана сильно зависит от продуцента, так при выделении из кефирных зерен она составляет порядка 1 – 10 МДа, в то время, как монокультурные продуценты вроде отдельных штаммов Lactobacillus kefiranofaciens дают только 55 – 700 Кда[7],[58]. Молекула полисахарида стабильна и по показателю устойчивости к гидролизу близка к целлюлозе. Это, главным образом, обусловлено сочетанием различных видов гликозидных связей[72]. Он растворим в воде, нерастворим в этаноле при концентрациях порядка 3,5 г/л происходит переход от истинного раствора к коллоидному. При концентрациях 6-14 г/л образует устойчивые криогели (рис. 14). Кефиран также обладает хорошими влагоудерживающими и эмульгирующими свойствами и может составить конкуренцию на рынке таким загустителям и гелеобразователям, как камеди и слизи[55],[7]

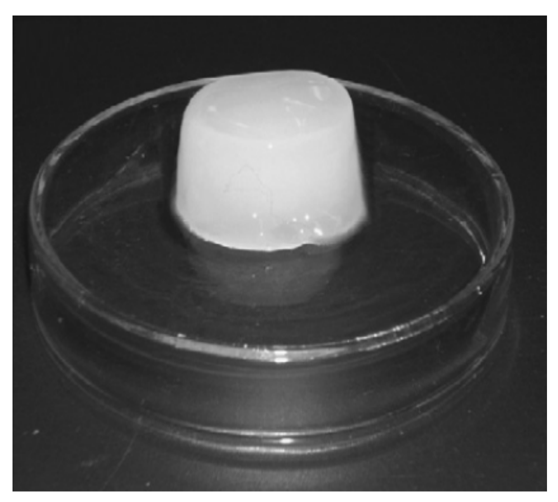


Рисунок 14: Криогель раствора кефирана с концентрацией 10,8 г/л [55]

.

Отдельно стоит отметить антимикробные свойства кефирана. В концентрациях больше или равных 50 мкг/мл этого полисахарида наблюдалось полное ингибирование роста таких патогенов, как Staphylococcus aureus, Streptococcus Salivarius, Pseudomonas aeroginosa, Streptococcus pyogenes и Listeria monocytogenes. При сравнении радиусов вокруг дисков с антибиотиками и кефираном последний показывал на 50-100% больший радиус вокруг диска.

Опыты по заживлению ран, проведенные на крысах также показали высокую антимикробную активность кефирана: в одинаковые по площади повреждения кожи вносилась сначала суспензия S. aureus, содержащая 10^8 КОЕ. По прошествии 24 часов раны группы сравнения обрабатывались физраствором, раны двух других групп обрабытывались мазью клостебола-неомицина и раствором кефирана соответственно. По прошествии восьми дней раны, обработанные кефираном были в четыре раза меньше, чем обработанные физраствором и в полтора раза меньше, чем обработанные мазью с неомицином-клостеболом (рис. 15)[14].

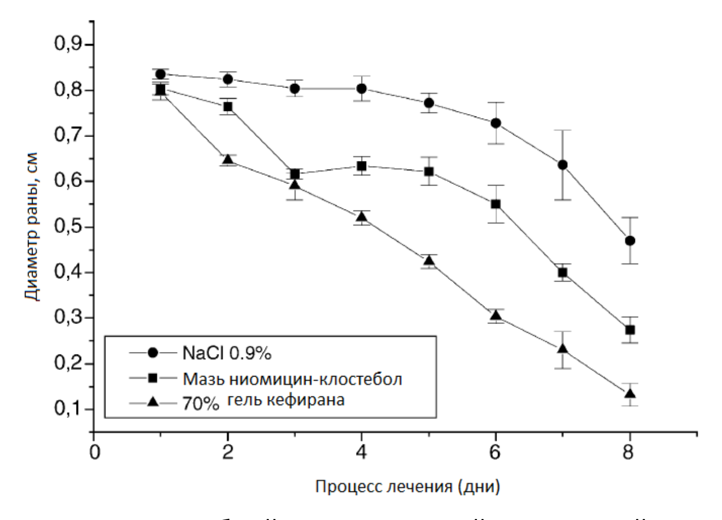


Рисунок 15: Сравнение антимикробной и заживляющей активностей геля кефирана и мази клостебола-ниомицина относительно контрольной группы, не проходящей лечение. [14].

Стоит также отметить, что синтез кефирана возможен не только при росте на молоке, но также и на ряде углеводных субстратов, например гидролизате риса, причем его структура будет идентичная независимо от источника углерода[91],[58]. Синтез полисахарида, главным образом, осуществляют бактерии вида Lactobacillus kefiranofaciens, однако ряд исследователей сообщает, что другие виды лактобацил в некоторых условиях способны к его синтезу, например, Lactobacillus brevis [72].

2.9.2 МИКРОБНЫЙ ПРОФИЛЬ

Сообщество кефирных грибков отличается огромным разнообразием видов, на которое влияет целый ряд факторов: как глобальных, так и локальных. Главными глобальными факторами являются географическое положение и климатические условия того места, откуда был взят кефирный грибок. Среди локальных факторов важное место играет происхождение и качество молока, а также температурный режим. Также большую роль на микробный профиль сообщества и химический состав культуральной жидкости играют на первый взгляд незначительные параметры, такие как качество перемешивания, соотношение инокулят – свежее молоко и, наконец предварительная промывка кефирных грибков от культуральной жидкости перед засевом[7].

Также стоит отметить, что получаемый микробный профиль сильно зависит от способа характеристики сообщества. При использовании классических микробиологических методов, основанных на выделении чистых культур и их характеристике будут одни результаты видового разнообразия и соотношения видов, а при анализе 16 s РНК микроорганизмов выявляется значительно большее количество микроорганизмов и иное соотношение их в сообществе[98],[7].

Экологической нишей сообщества является молоко, поэтому большая часть микроорганизмов адаптирована к катаболизму лактозы, некоторые представители используют продукты жизнедеятельности других членов сообщества. Главным продуктом лактобактерий является молочная кислота, дрожжи, в свою очередь, производят углекислый газ и этанол, сопутствующие микроорганизмы сообщества выделяют органические кислоты (уксусную, пропионовую, муравьиную), ацетоин, ацетальдегид и ряд спиртов (пропиловый и изоамиловый)[98],[7].

2.9.2.1 МИКРОСКОПИЯ СРЕЗА

На срезе кефирных грибков видны тонкие переплетающиеся нити, образующие строму грибка. Именно они и являются каркасом, удерживающим остальные микроорганизмы сообщества. Присутствуют различные дрожжевые клетки, на их поверхности находятся кокковидные формы, палочковидные формы, в свою очередь занимают пространство между дрожжами(рис. 16 а, б). Плотность клеток в центре ниже. Дрожжевые клетки есть как в глубине колонии так и на поверхности, бактериальных клеток в центре практически наблюдается.

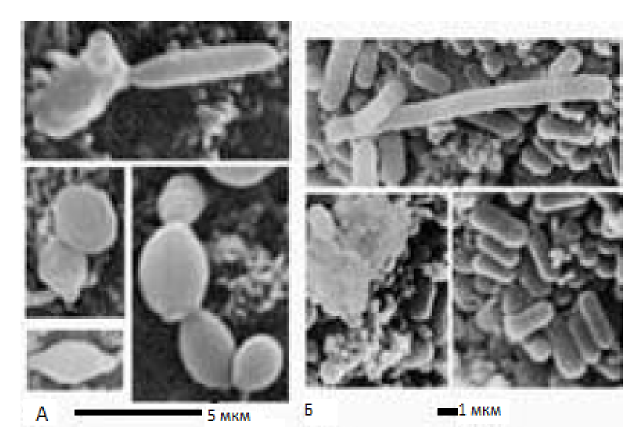


Рисунок 16: Сканирующая электронная микроскопия среза А – различные виды дрожжей, Б – кокки, бациллы и лактабациллы

2.9.2.2 МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ

Метагеномный анализ показывает, что в зернах различных кефирных грибков присутствует около 50 различных видов микроорганизмов. Однако в одном конкретном образце присутствует обычно 6-11 видов, реже больше. Метагеномный анализ проводится с помощь амплификации ДНК большинства присутствующих микроорганизмов и их последующем разделении с помощью денатурирующего градиентного гель электрофореза в полиакриламиде (рис. 17). Однако даже в таких условиях микроорганизмы, присутствующие в кефирных зернах в незначительном количестве могут быть не учтены, либо родственные геномы могут быть приняты за широкую полосу одного вида.[98], [2].

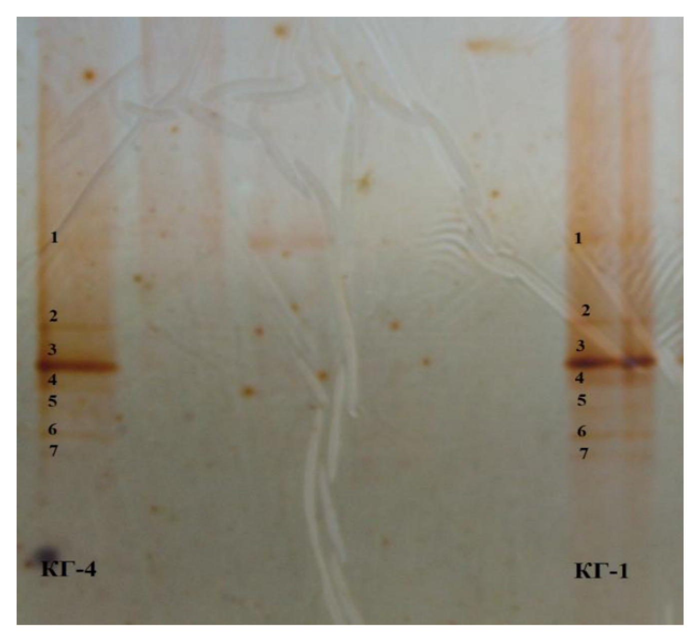


Рисунок 17: Пример форереграммы двух практически идентичных сообществ кефирных грибков, каждая полоса соответствует одному виду [2]

Данный метод обладает большей точностью, однако с ним также сопряжен ряд трудностей: при использовании специфических праймеров количество всех видов будет примерно одинаковым и будет сложно установить соотношение видов в сообществе. С другой стороны, при использовании универсалльных праймеров количество копий будет тем выше, чем больше генетического материала данного вида присутствует в среде. Еще одним существенным недостатком явялется возможность появления «новых или некультивируемых» микроорганизмов из-за случайного синтеза химерных ампликонов в процессе ПЦР[7].

Полученные таким способом данные говорят, что доминирующими видами являются представители родов Lactobacillus, составляющие больше половины всех микроорганизмов сообщества, дрожжевые культуры представлены видами Saccharomyces unisporus, Candida kefir, Kluyveromyces marxianus, также иногда встречаются представители рода Pichia[37].

2.9.2.3 МЕТОД ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Использование классических микробиолгических методов основано на растирании кефирных грибков с последующим высевом на различные питательные среды и дальнейшем выделении чистых культур. Помимо морфологического и биохимического анализов выделенных штаммов с целью идентификации микроорганизмов дополнительно проводят анализ 16 s РНК для бактериальных культур и 26 s РНК для дрожжевых культур[98]. Таким методом обнаружено около 20 видов дрожжей и столько же видов молочнокислых бактерий. Недостатком данного метода является то, что отдельные культуры в одиночку могут не расти или не воспроизводить некоторые биохимические функции[7]. Например, у Lactobacillus kefiranofaciens наблюдается сниженный выход кефирана после нескольких пересевов на синтетическую среду[60]. И хотя для некоторых микроорганизмов удается подобрать специфические среды, процесс весьма сложен. При культивировании сообщества в неоптимальных условиях или воздействии разнообразных стрессов возможно вымирание отдельных видов, чья изначальная доля была невысока. Иногда при изменении состава среды может произойти смена доминантных видов[7],[2].

Полученные этим методом данные также говорят о том, что представители рода Lactobacillus являются доминирующими и могут составлять от 70 до 90% всей микрофлоры кефирных грибков. Стрептококки обычно составляют около 8%, дрожжи до 3%, уксуснокислые бактерии 0,05%. Такое низкое содержание дрожжей может быть обусловлено их прочной связью со стромой кефирных грибков, что затрудняет их отделение. Также при использовании данного метода анализа разнообразие дрожжей значительно падает, неизменным остается только присутствие представителей рода Saccharomyces[7].

2.9.2.4 ОБЩИЕ ВЫВОДЫ ПО МИКРОФЛОРЕ КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ

Оба метода имеют свои сильные и слабые стороны, так некоторые виды удавалось идентифицировать толькоодним из них. Несмотря на некоторые различия в методах исследования, можно сказать, что, в кефирных грибках представлено четыре основных группы микроорганизмов: дрожжи, уксуснокислые бактерии, молочнокислые палочки и молочнокислые кокки[7], [2].

На поверхности преобладают бактериальные культуры, по мере продвижения вглубь гранулы, количество дрожжей увеличивается, а бактерий, наоборот, падает[98]. Это обусловлено разной степенью адгезии клеток разных видов к кефирным зернам, а также от различного притока тех или иных субстратов вглубь кефирного зерна: так снаружи, где лактоза является основным субстратом представлено только ограниченное количество лактозо-сбраживающих дрожжевых культур. По мере продвижения вглубь зерна лактобактерии сбраживают лактозу и выделяют лактат, который утилизируют дрожжи. Помимо метаболического распределения возможно распределение по аэротолерантности. Также стоит отметить, что крайне низкий pH внутри кефирных зерен подавляет рост кокковых форм, которые по этой причине там и не обнаруживаются[7].

2.9.3 ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ВНУТРИ СООБЩЕСТВА

Сообщество зерен кефирных грибков характеризуется огромным видовым разнообразием и его видовой состав зависит от ряда факторов, как например, географическое происхождение, используемое молоко, температурный режим и другие условия культивирования, а также метода исследования видового состава сообщества[98],[7].

Стоит также отметить, что при сохранении условий постоянными сообщество также является стабильным и воспроизводимым на протяжении неограниченного промежутка времени [37].

Клетки в составе сообщества растут, не как автономные особи, а находятся в постоянном взаимодействии друг с другом. Помимо системы сигнальных молекул (подробно рассмотренную в пункте 5 чувство кворума) важную роль в структуре взаимоотношений играют их трофические взаимодействия. Именно благодаря им происходит объединение, как различных видов одного рода, так и разных родов или даже эукариотов и прокариотов.

Часто кооперация происходит за счет невозможности тех или иных организмов метаболизировать определенный субстрат. Тогда в ходе кооперации происходит перенос метаболитов: одни микроорганизмы продуцируют то или иное соединение, другие – метаболизируют[7]. Так, например, очень ограниченное количество дрожжевых культур, выделенных из кефирного сообщества были способны к усвоению лактозы, но в то же время были способны катаболизировать галактозу, лактат или цитрат. То есть для их существования необходимо присутствие микроорганизмов, расщепляющих лактозу. Некоторые виды дрожжей, выделенных из кефирного сообщества способны к катаболизму жиров и белков, так ряд представителей S. cerevisiae и K. marxianus имеют протеолитическую активность, а представители Yarrowia lipolytica липазную[98],[37].

Взаимоотношения внутри сообщества могут быть разнообразными, главное, чтобы они обеспечивали наибольшую устойчивость всего сообщества в рамках естественного отбора, что обычно выражается в максимально эффективном использовании энергии (за счет полного окисления исходного субстрата) [7].

Взаимоотношения между участниками микробного сообщества могут варьироваться от антагонизма, заключающегося во взаимном ингибировании роста и конкуренции за субстрат, до мутуализма, когда виды обмениваются веществами, синтезировать которые они неспособны[37]. Так для не сбраживающих лактозу дрожжей лактобактерии, способные это делать являются симбионтами, в то время, как между собой дрожжи активно конкурируют за ограниченный субстрат, либо могут вступать в коалиции для его использования[7].

Также стоит отметить, что по мере истощения одних и появления других субстратов изменяется и соотношение между организмами, например при исчерпании лактозы и накоплении молочной кислоты популяция лактобактерий начнет уменьшаться или останется без изменений, в то время как микроорганизмы, способные к утилизации лактата продолжат свой рост[37],[7].

2.9.4 ВЗАИМООТНОШЕНИЯ С ДРУГИМИ МИКРО- И МАКРООРГАНИЗМАМИ

Сообщество кефирных грибков вступает в антагонистические взаимоотношения с целым рядом микроорганизмов, включая грибы родов Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Mucor, Absidia, Rhysopus, гнилостных бактерий и патогенов. Поэтому сброженное ими молоко (кефир), содержащее в своем составе остаточное количество микроорганизмов обладает пробиотическим эффектом[37],[7].

Отдельно стоит отметить антимикробную активность созревшего кефира после отделения грибков против таких патогенных микроорганизмов как Staphylococcus aureus и Listeria monocytogenes, а также уже упоминавшееся ускоренное заживление ран на крысах[37].

Более того кефир и содержащийся в нем кефиран способны оказывать иммуностимулирующий эффект, даже при десятикратном разбавлении. Это происходит за счет стимулирования выработки неспецифических имуноглобулинов класса G. Ряд исследователей сообщают также о противоопухолевом эффекте для некоторых видов рака[37]. Кефир по сравнению с молоком, имеющим тот же процент жирности, показал значительно более высокие антиокислительные и антимутагенные свойства, при применении параллельно с радиотерапией наблюдалось значительное снижение апоптоза клеток пациентов.

3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 ОБЗОР ИСПОЛЬЗУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

3.1.1 КЕФИРНЫЕ ГРИБКИ

В исследовании использовались кефирные грибки (домашнего культивирования Московская область). Они представляют собой небольшие гранулы неправильной формы. Размер наименьших образований составлял около 1-2 мм, крупные гранулы в наибольшем измерении достигали 1,5 см (см. рис. 18). Цвет кремово-белый, консистенция упругая. Гранулы покрыты трудно отмываемой бесцветной слизью, предположительно полисахаридного происхождения (на рисунке видны следы слизи вокруг гранул). Они обладают специфическим запахом и слабым вкусом, в воде тонут.



Рисунок 18: Образец кефирных грибков, используемых в экспериментах

До начала проведения исследования хранение промытых кефирных грибков осуществлялось в банке с водопроводной водой при 4 °С. Перед началом исследования проводилась регенерация культуры, этот процесс будет описан в следующем разделе.

3.2 ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА И МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Культивирование лактобактерий проводилось в модифицированной среде MRS следующего состава (г/л): глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 15, триптон – 10, ацетат натрия – 5, цитрат триаммония – 2, K_2HPO_4 – 2, $MgSO_4$ – 0,2, $MnSO_4$ – 0,05. Для приготовления твердых питательных сред добавлялся агар до конечной концентрации 15 г/л.

Культивирование на жидкой питательной среде проводилось в пробирках, объемом 15 мл, содержащих 9 мл свежей стерильной среды в течение 24 часов в термостате при температуре 37 ºС (кроме опыта по изучению влияния температуры). Затем по прошествии этого времени проводилось перемешивание содержимого пробирки на вихревой мешалке до создания идеальной суспензии без осадков и отложений клеток на дне и стенках пробирок. Далее пробирка помещалась в штатив в вертикальном положении, по прошествии 15 минут производился отбор наиболее крупных форм со дна пробирки.

Процедура отбора проб заключалась в следующем: стерильную пипетку разворачивали в потоке восходящего воздуха в радиусе 5-7 см от пламени горелки, указательным пальцем зажимали верхний конец, пипетку опускали в пробирку до дна, затем резко разжимали и снова зажимали верхний конец пипетки, так чтобы в неё успело попасть около 0,5 – 1 мл суспензии клеток со дна. Далее суспензию клеток сливали в пробирку со свежей питательной средой, не касаясь стенок или среды (на внешней стороне пипетки находились свободно живущие не агригирующие формы).

Параллельно для ускорения процесса мутагенеза и адаптации к окислительному стрессу производилось культивирование с различными концентрациями пероксида водорода (25, 50 и 100 мкг/мл). Отличие данного процесса от описанного выше заключалось в следующем: по прошествии 24 часов культивирования в среду вносилось 17,5, 34 или 67,5 мкл 3% раствора пероксида водорода. В течение первых 15 минут перемешивания не производилось для ускорения гибели свободноживущих неоседающих форм от более высокой концентрации пероксида водорода в верхних слоях среды в пробирке. Затем производилось перемешивание на вихревой мешалке и 15-минутное отстаивание по схеме описанной выше. За счет частичного расхода пероксида водорода на свободно живущие формы летальность его воздействия на донные агрегаты была меньше, играя преимущественно роль мутагена.

Периодически для ускорения процесса селекции и очистки от свободноживущих форм производился высев на чашки Петри методом Коха (см. рис. 19) с последующим рассевом отдельных колоний в пробирки (см рис 20).

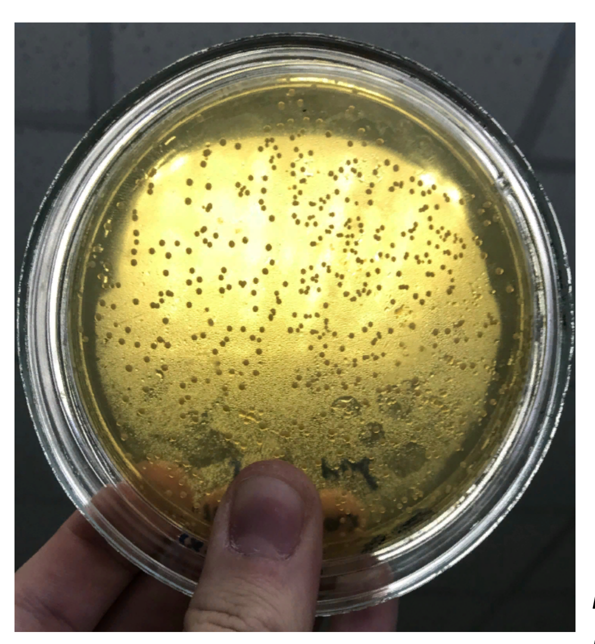


Рисунок 19: колонии на чашке Петри после высева седьмого разведения.

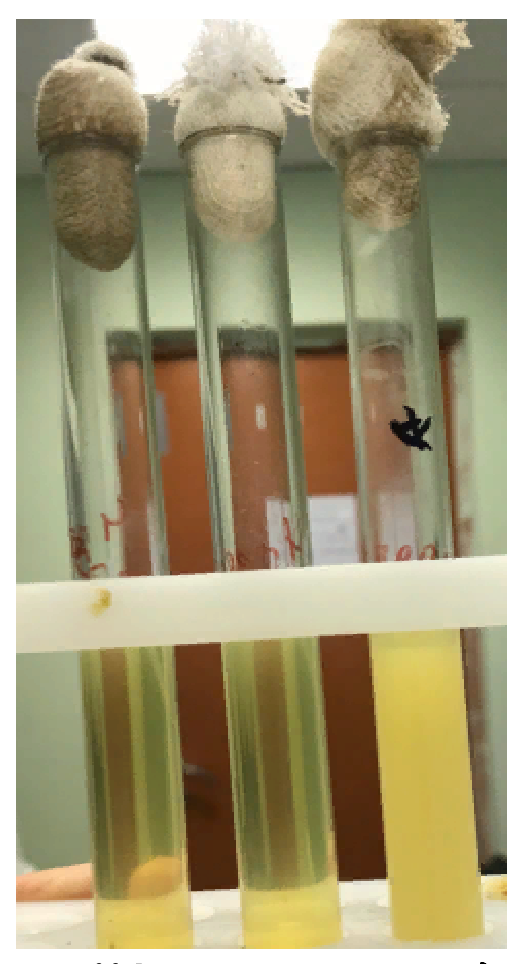


Рисунок 20:Результаты рассева отдельных колоний, две пробирки слева — агрегирующие формы справа -- нет

Регенерация и последующее культивирование кефирных грибков производилось на молоке, содержащем 3,2 % жира при комнатной температуре равной 25 ^{o}C (в дневное время суток) в течение 24 часов **(**см. рис. 21).



Рисунок 21: колба, содержащая сброженное молоко (кефир). В первый раз из-за большого количества инокулята кефирных грибков за 24 часа ферментации произошло перебраживание, в дальнейшем это было исправлено внесением меньшего количества инокулята в тот же объем молока.

Затем проводилось извлечение кефирных зерен из сброженного молока с помощью мелкого сита и промывание под струей холодной воды до полного удаления остатков сброженного молока и внешнеклеточной слизи. Далее проводился засев в свежее молоко с целью наработки биомассы кефирных грибков.

Для опытов проводился засев 1 ± 0,1 грамма активных кефирных зерен на 100 мл молока, идентичного тому, на котором ранее проводилось их культивирование, в колбы объемом 200 мл. При проведении опыта по изучению осмотолерантности в молоко предварительно вносилось определенное количество хлорида натрия и размешивалось до исчезновения осадка, в остальном состав молока не изменялся. Для создания одинаковых условий в одном опыте использовалось молоко из одного пакета.

3.3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Определение оптической плотности растворов производилось фотометрически на фотометре iMark. Использовался стандартный световой фильтр на длину волны, равную 505 нм. Для повышения точности измерений на протяжении всей работы использовался один и тот же планшет. Также перед каждым измерением проводилось определение оптической плотности самих ячеек планшета (предварительно промытых дистиллятом и высушенных).

Для создания случайной выборки перед взятием каждой пробы производилось перемешивание пробирки на вихревой мешалке. Все пробы отбирались в трех повторностях, далее находилось среднее арифметическое их оптических плотностей и рассчитывались среднеквадратичные отклонения. Планировалось также построить калибровочный график для оседающего и неоседающего штаммов, однако ввиду образования прочных агрегатов даже при активном перемешивании селекционным штаммом количество КОЕ не соответствует истинному количеству клеток в суспензии, поэтому от этой идеи было решено отказаться.

3.4 МИКРОСКОПИРОВАНИЕ

В данной работе применялось только микроскопирование фиксированного фуксином препарата с использованием микроскопа Levenhuk MED 45B при разрешении 10x100. Процесс подготовки пробы происходил следующим образом:

1. Чистое предметное стекло обезжиривалось путем прокаливания в пламени горелки с последующим охлаждением до комнатной температуры или с помощью таких химических реагентов, как этанол или гексан.

2. На поверхность стекла наносилась небольшая капля водопроводной воды.

3. Стерильной пипеткой отбиралось небольшое количество суспензии из пробирки, затем поверх капли водопроводной воды помещалась капля суспензии.

4. Заранее прокаленной и охлажденной петлей суспензия перемешивалась и распределялась по стеклу тонким слоем.

5. Предметное стекло с мазком сушилось при комнатной температуре.

6. Высохший мазок закреплялся, путем перемещения в пламени горелки 3-4 раза той стороной, на которую были нанесены микроорганизмы. Это делалось для их убийства, чтобы обезопасить дальнейшую работу с ними, а также облегчить дальнейшее окрашивание. Важно также не фиксировать недосушеный мазок, так как при закипании воды возможна деформация клеток.

7. Фиксация проводилась нанесением 2-3 капель карболового фуксина (1:10) с последующей выдержкой около 30 секунд

8. Производился смыв избытка красителя дистиллированной водой. При правильном проведении фиксации мазок на стекле должен оставаться окрашенным и не вымываться.

9. Проводилось удаление избытка воды с помощью фильтровальной бумаги.

10. На окрашенный участок наносилось иммерсионное масло (в данном случае кедровое)

11. При микроскопировании использовался специальный иммерсионный объектив.

3.5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ С ПОМОЩЬЮ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Для определения концентрации молочной кислоты в культуральной жидкости применялась обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография. В данном исследовании использовался хроматограф Agilent LC1220 с колонкой Zorbax Eclipse Plus C18.4.6 x 150mm. Используемый элюат имел следующий состав на 1 л бидистиллированной воды: 1,36 г KH_2PO_4, 20 мл ацетонитрила. Показатель pH раствора был равен 3,0 для этого использовалась ортофосфорная кислота. Температура хромотографирования 30±0,1^{o}C при скорости протока 0,3 мл/мин.

Непосредственно для определения наличия молочной кислоты и её концентрации использовался встроенный спектрофотометр с фильтром на длину волны, равную 210 нм. Расчет концентрации проводился программой хроматографа относительно внешнего стандарта.

В тех случаях, когда биомасса лежала на дне и была вероятность неоднородности состава культуральной жидкости в зависимости от уровня пробоотбора проводилось предварительное перемешивание суспензии на вихревой мешалке. Затем пробы центрифугировались при 9000 об/мин в течение 15 минут для отделения биомассы.

3.6 ТИТРОВАНИЕ ПО ТЁРНЕРУ

Перед титрованием содержимое 200-миллилитровых колб тщательно перемешивалось и гомогенизировалось, кефирные грибки отделялись фильтрованием через сито, полученный фильтрат титровался согласно методике приведенной ниже.

Согласно ГОСТ 3624-92 процедура титрования включает в себя следующие этапы:

1. В стакан вместимостью 50 $см^3$ отмеривалось 20 $см^3$ дистиллированной воды и 10 $см^3$ анализируемого продукта (в данном случае кефира), смесь тщательно перемешивалась. Ввиду того, что велось исследование кефира, обладающего сравнительно высокой вязкостью, для удаления его остатков из пипетки проводилось её промывание полученной смесью 3-4 раза.

2. В стакан помещалась мешалка и начиналось перемешивание

3. В стакан помещался потенциометр, так, чтобы он не касался мешалки

4. Титрование проводилось 0,1 М раствором гидроксида натрия до достижения точки эквивалентности (pH=8,9)

5. Если по истечении 30 с значение pH не менялось титрование считалось законченным.

6. Затраченный объем гидроксида натрия переводился в ^oT путем умножения на 10 (для кефира) и округления до десятых.

Для кисломолочных продуктов расхождение между двумя параллельными опытами не должно превышать 1,7 ^oT. Конечный результат являлся средним арифметическим двух параллельных измерений[1].

4 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

4.1 МОРФОЛОГИЯ

Ранее на кафдре биотехнологии в ходе длительной селекции был получен агрегирующий штамм Lactobacillus paracasei 4079. Морфологически штамм практически не отличается от исходного, за исключнением небольшого удлинения клеток и их плотной связи между собой (см. рис. 22)

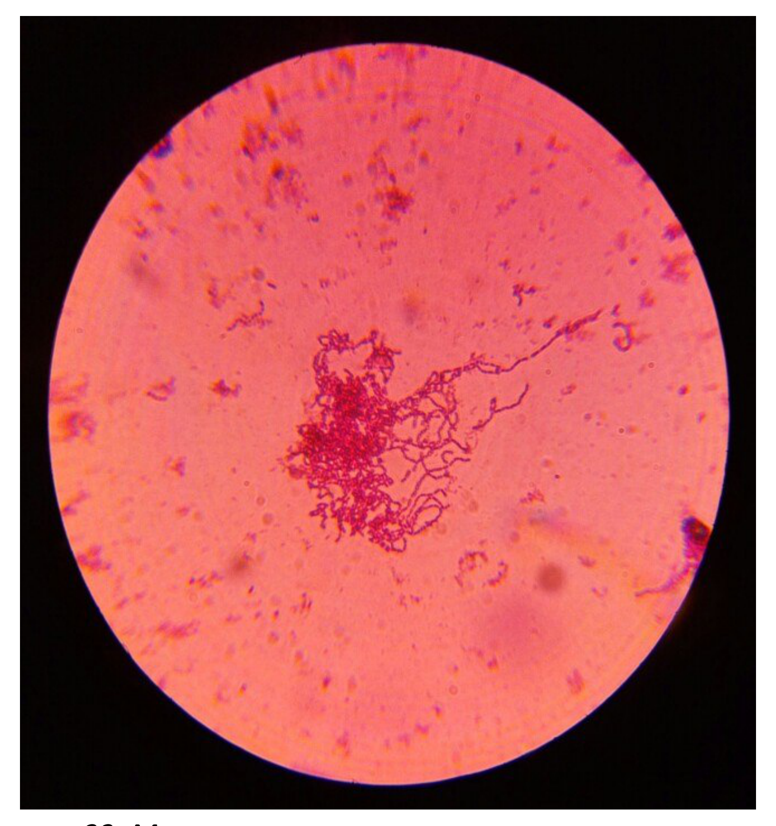


Рисунок 22: Микроскопия агрегата селекционного штамма

При культивировании в пробирках наблюдается образование хлопьевидных структур, которые оседают на дне и стенках (см. рис. 23). К сожалению, макро-агрегаты очень нестойки к механическому воздействию и разрушаются при перемешивании, в отличие от микроагрегатов, разрушить которые значительно труднее.

Отдельно стоит упомянуть, что агрегирующий штамм был менее конкурентоспособным и в отсутствие давящего гравитационного отбора постепенно вытеснялся свободноживущими клетками. Для очистки культуры от них периодически проводился рассев по методу Коха.

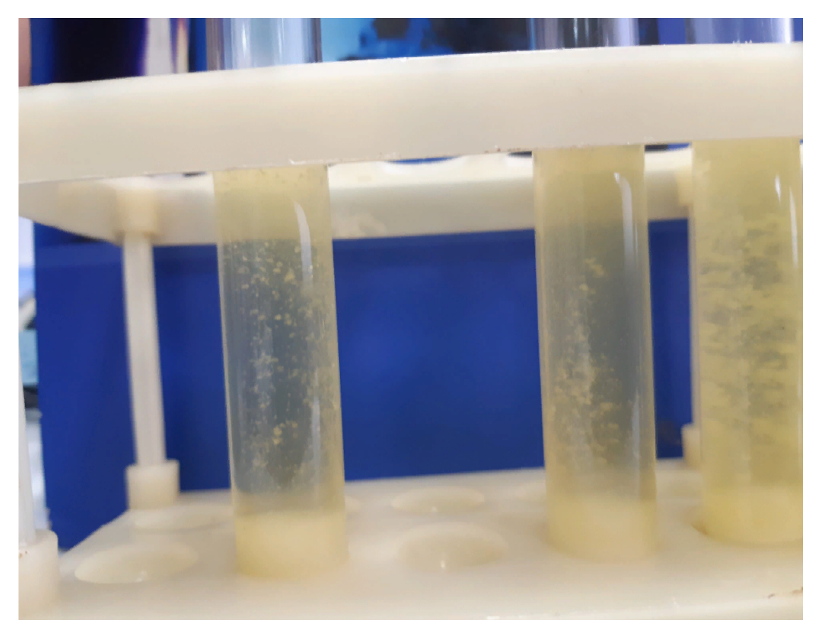


Рисунок 23: оседание агрегатов клеток со стенок пробирки из-за небольшого наклона пробирки в процессе культивирования

4.2 СРАВНЕНИЕ ШТАММОВ

С целью сравнения характеристик исходного штамма и селекционного был проведен ряд опытов по схеме, приведенной ниже (см. рис. 24). Перед началом опытов проводилась регенерация культуры в течение 24 часов, затем происходил рассев оседающего и неоседающего штамма и их культивирование в различных условиях, по прошествии 24 часов проводилось измерение ОП и отбирались пробы на хроматографию.

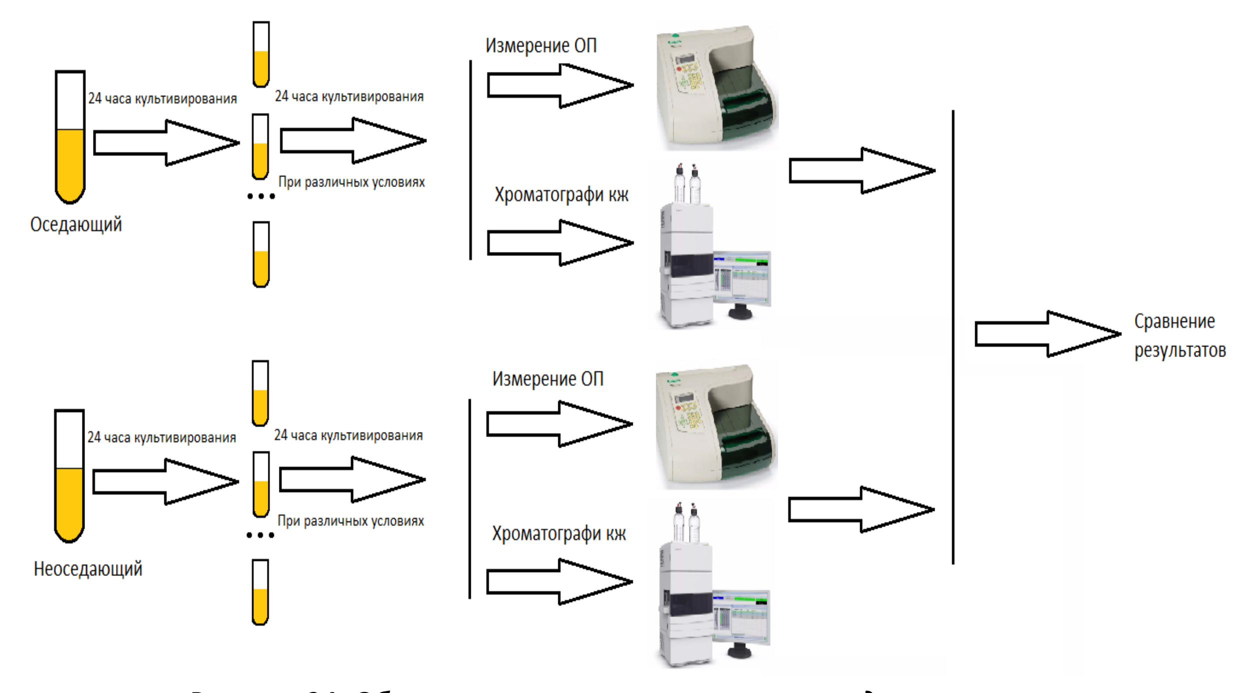


Рисунок 24: Общая схема опытов по сравнению двух штаммов

4.2.1 СРАВНЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА И СКОРОСТИ РОСТА ШТАММОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Из анализа экспериментальных данных видно, что различия в количестве выросшей за 24 часа культивирования биомассы для штаммов находятся в пределах погрешности. Только для культивирования при 43 ºС наблюдается значимое различие в количестве биомассы, выходящее за границы среднеквадратичного отклонения (см. рис. 25). Также видно, что при температурах выше 40 ºС наблюдается существенное снижение оптической плотности для обоих штаммов, что позволяет заключить о приближении к верхней границе температурного оптимума.

Образование агрегатов и изменение формы клеток оседающего штамма также снижает точность анализа. То есть достоверно нельзя сказать, является ли незначительно большая оптическая плотность неоседающего штамма показателем его большей скорости роста.

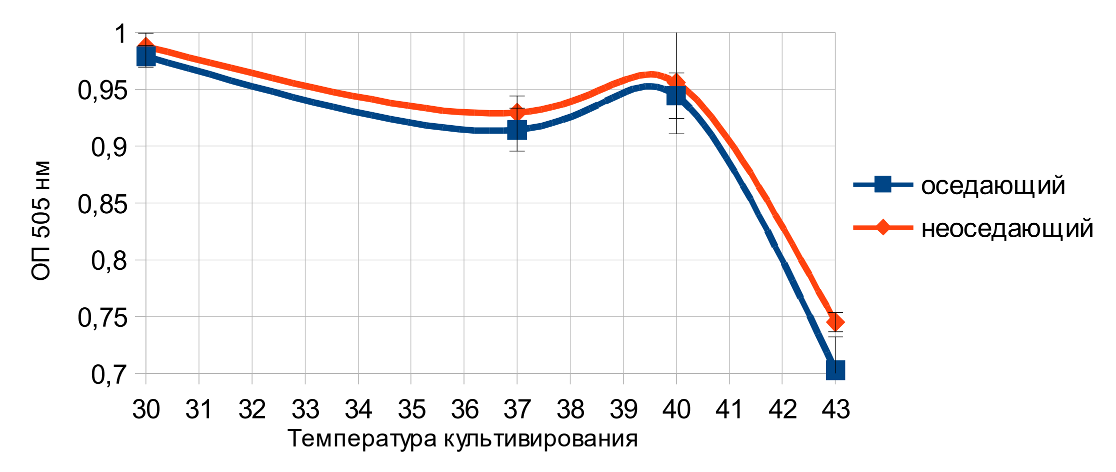


Рисунок 25: Оптическая плотность суспензии при 505 нм за 24 часа культивирования при различных температурах (суспензия разбавлена в 2 раза)

Однако стоит отметить, что оседающий штамм показал несколько больший выход молочной кислоты (около 5%) при культивировании при температуре 30 ºС, по сравнению с неоседающим. В свою очередь, неоседающий штамм показал более высокие выходы молочной кислоты при 37 ºС, где разница существеннее и составляет порядка 15% (см. рис. 26).

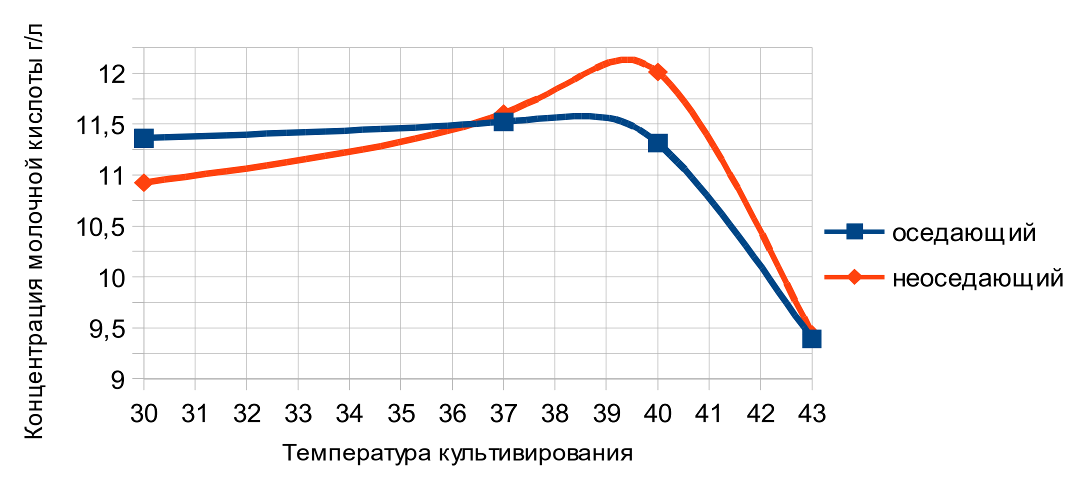


Рисунок 26: Прирост молочной кислоты за 24 часа культивирования при различных температурах

Интересные данные наблюдаются и для степени потребления глюкозы обоими штаммами (см. рис. 27). Неоседающий штамм имеет максимум степени потребления глюкозы при 37 °С, что говорит об оптимальности данной температуры культивирования.

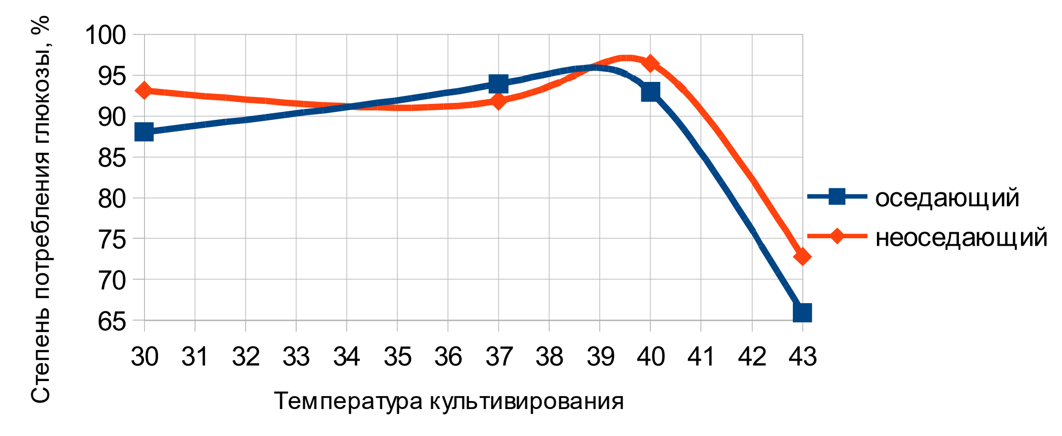


Рисунок 27: Процент потребления глюкозы от исходного количества за 24 часа культивирования

Для анализа экономических коэффициентов по молочной кислоте нужно соотнести выходы молочной кислоты и потребление глюкозы. Эти результаты приведены на рисунке 28.

Возможным объяснением высоких экономических коэффициентов по молочной кислоте в опытах может объясняться тем, что при культивировании на богатой питательной среде, содержащей триптон и дрожжевой экстракт учесть точное количество источников углерода в среде представляется затруднительным.

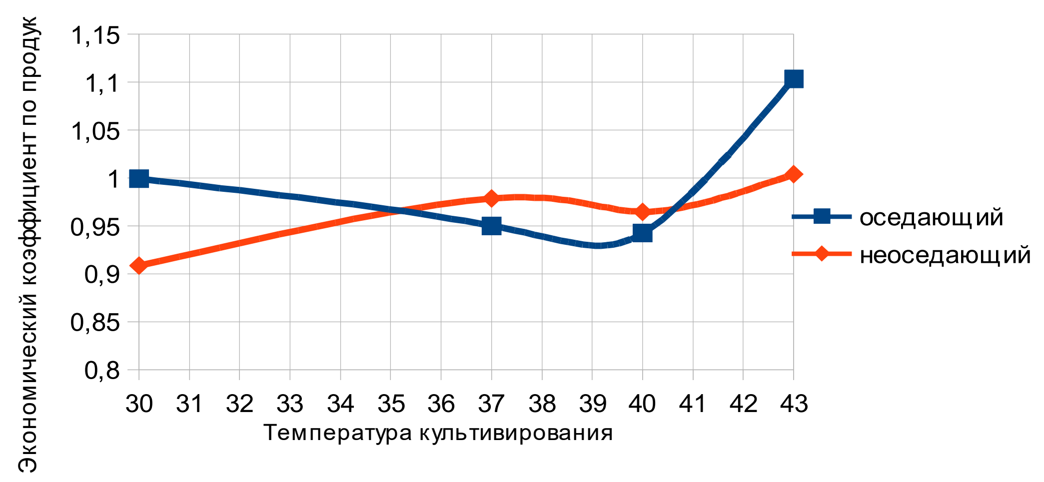


Рисунок 28: Экономические коэффициенты по продукты за 24 часа культивирования при различных температурах

Из анализа графика видно, что при 30 °С оседающий штамм метаболизировал глюкозу в большей степени для синтеза молочной кислоты, чем для прироста биомассы. Если учесть также неполное потребление глюкозы при данной температуре, возможно предположить, что при большем времени культивирования глюкозы была бы потреблена полностью.

Интересной является противоположная тенденция изменения экономического коэффициента по продукту для оседающего и неоседающего штаммов при росте температуры до 40 °С: для оседающего штамма экономический коэффициент падает, в то время как для неоседающего растет.

С другой стороны мы видим, что при проведении процесса культивирования при 43 °С наблюдаются исключительно высокие экономические коэффициенты по продукту для обоих штаммов. Это объясняется тем, что при снижении скорости роста микроорганизмов и, как следствие, их ферментативной активности, более существенную роль на «выход молочной кислоты» начинает играть молочная кислота, внесенная в среду вместе с инокулятом.

Обобщая всё выше упомянутое, можно сказать, что у селекционного и исходного штаммов наблюдалось несколько отличное поведение при культивировании. И хотя прирост биомассы был практически одинаковым для обоих штаммов, выходы молочной кислоты колебались.

4.2.2 СРАВНЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА И СКОРОСТИ РОСТА ШТАММОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ХЛОРИДА НАТРИЯ В СРЕДЕ

Повышение осмотического давления за счет увеличения концентрации в соли негативно влияет как на выход молочной кислоты, так и на прирост биомассы для обоих штаммов.

Показатели оптической плотности оседающего и неоседающего штаммов совпадают в контрольных пробирках (0 М соли). На промежутке от 0,25 М до 1 М неоседающий штамм растет быстрее, даже учитывая среднеквадратичные отклонения. Начиная с концентрации хлорида натрия равной 1,25 М и выше, оптическая плотность обоих штаммов находится примерно на одном уровне (см. рис. 29).

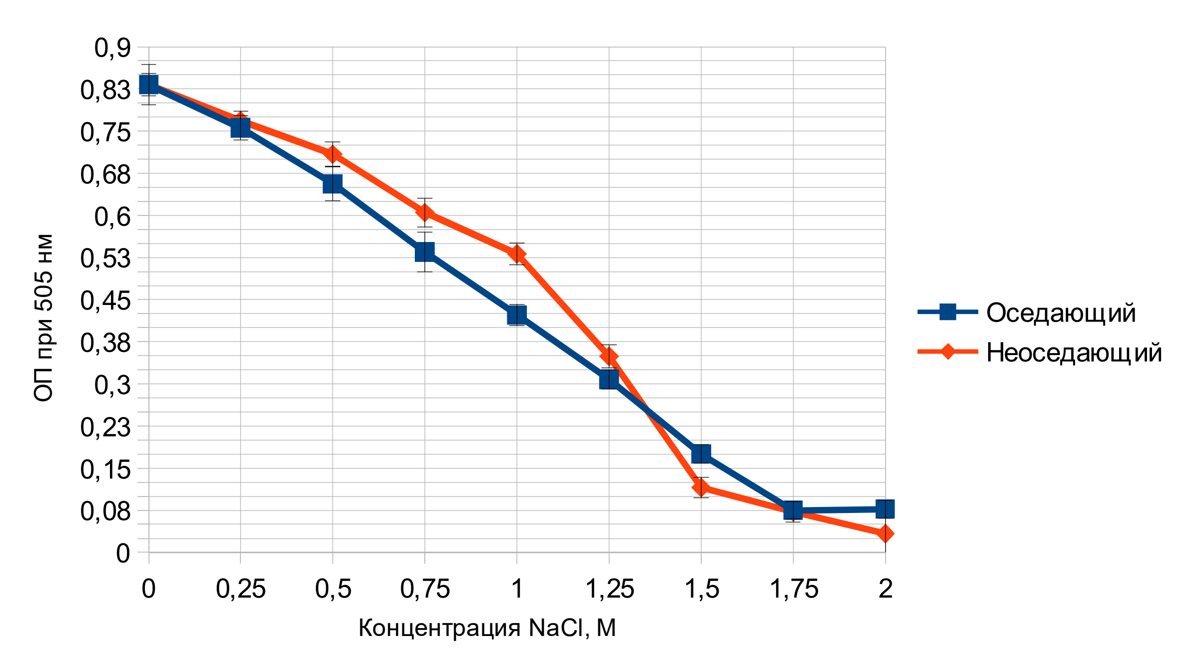


Рисунок 29: Оптическая плотность суспензии клеток при 505 нм после 24 часов культивирования на средах с различным содержанием хлорида натрия

Это можно объяснить тем, что при сравнительно низком значении осмотического давления рост свободно живущих клеток происходит быстрее, а с повышением концентрации соли медленно растущий оседающий штамм приобретает некоторое преимущество, догоняя по скорости роста неоседающий. С другой стороны на результаты измерения ОП оседающего штамма оказывает форма его клеток и их адгезия друг с другом, предположительно занижая результаты.

Анализ выхода молочной кислоты обоими штаммами показал следующие результаты: оседающий штамм производит большее количество молочной кислоты, чем свободно живущие клетки неоседающего штамма. Причем, по мере повышения концентрации соли в среде разрыв между конечными выходами молочной кислоты увеличивается (см. рис. 30).

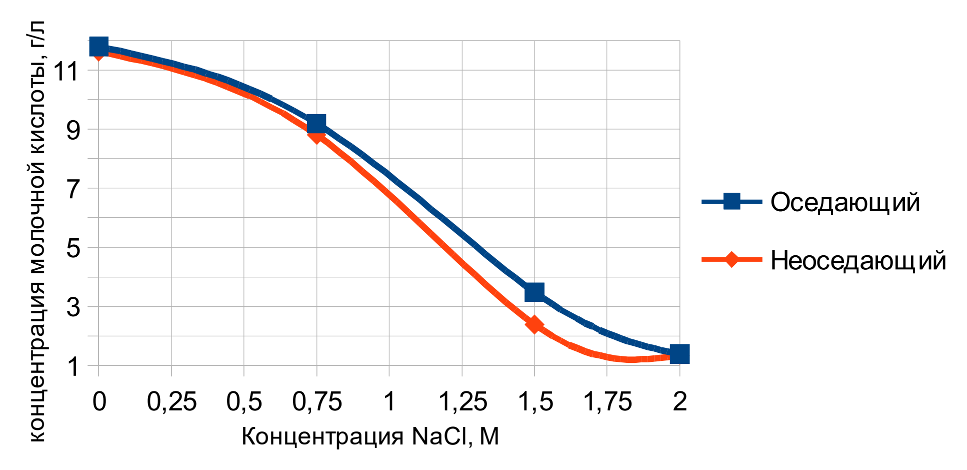


Рисунок 30: Конечная концентрация молочной кислоты за 24 часа культивирования при различных концентрациях хлорида натрия в среде

Если учесть также несколько большую степень потребления глюкозы неоседающим штаммом (см. рис. 31) можно предположить, что штаммы имеют несколько отличающийся метаболизм: в неоседающем штамме активнее идут процессы анаболизма.

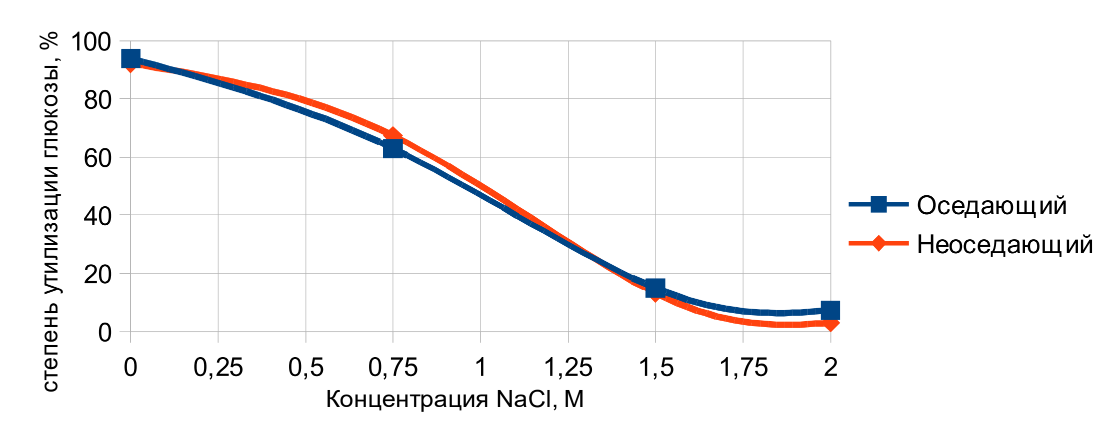


Рисунок 31: Степень утилизации глюкозы за 24 часа культивирования при различных концентрациях хлорида натрия в среде

Экономические коэффициенты по молочной кислоте приведены на рисунке 32. Из анализа диаграммы видно, что значения экономических коэффициентов целесообразно учитывать на отрезке до концентрации соли в среде равной 0,75 М.

Это обусловлено тем, что изменение состава среды за счет объема инокулята незначительно по сравнению с её изменением за счет ферментативной активности клеток. Далее с повышением концентрации хлорида натрия в среде наблюдается существенное снижение титра клеток, а также падение общего количества молочной кислоты и потребленной глюкозы. Именно здесь основное влияние на экономический коэффициент начинает оказывать молочная кислота, внесенная вместе с инокулятом.

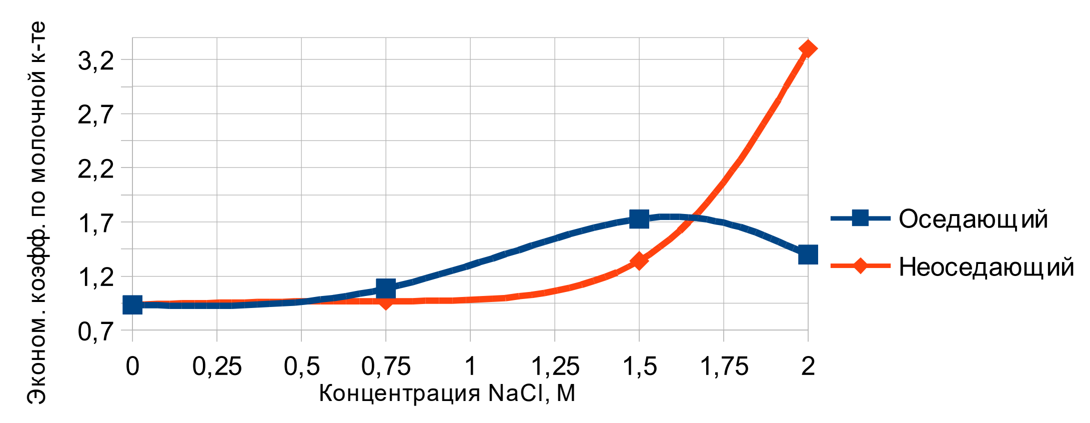


Рисунок 32: Экономические коэффициенты по молочной кислоте за 24 часа культивирования при различных концентрациях хлорида натрия в среде

В целом, же селективный штамм несильно отличался от исходного по осмотолерантности и температурному оптимуму.

4.2.3 ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЛАНЫ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ СЕЛЕКЦИОННОГО ШТАММА И СРАВНЕНИЮ ЕГО ХАРАКТЕРИСТИК С ИСХОДНЫМ

Для более полной температурной характеристики планируется провести дополнительные культивирования при температурах ниже 30 °С и выше 43 °С.

Осмотолерантность планируется также исследовать для другого электролита (KCl) и двух неэлектролитов (глюкозы и сахарозы).

Кроме того, планируется провести сравнение штаммов по их ацидофильности, толерантности к молочной кислоте, ингибирующим концентрациям антибиотиков, а также определить спектр потребляемых субстратов.

Ввиду отличия морфологического строения оседающего штамма и неоседающего, а также для установления возможных причин биохимических различий планируется провести секвенирование некоторых участков генома обоих штаммов и сравнить их.

4.3 КЕФИРНЫЕ ГРИБКИ

4.3.1 ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СООБЩЕСТВО КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ

В виду сложного состава молока и невозможности прямой оценки концентрации молочной кислоты было сделано допущение, что вся выделяемая кефирными грибками кислота является молочной, которая затем титровалась по методу Тёрнера.

Культивирование кефирных зерен при различных температурах показало следующую зависимость кислотности, приведенную на рисунке 33. Такой характер зависимости говорит о наличии различных по термофильности групп лактобактерий, одни из которых имеют оптимум при средних температурах около 30 °С, другие же при более высоких, с оптимумом в 40 °С. Отдельно стоит отметить, что при температуре культивирования равной 43 °С наблюдалась наибольшая вязкость культуральной жидкости, то есть с ростом температуры растет количество выделяемых экзополисахаридов, вероятно, как ответ повышенную температуру.

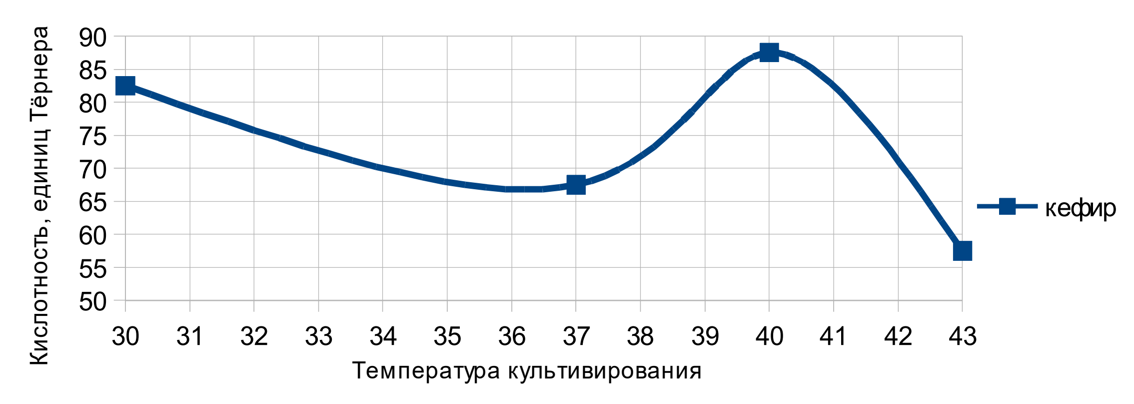


Рисунок 33: зависимость кислотности кефира за 24 часа культивирования при различных температурах

4.3.2 ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРИДА НАТРИЯ В СРЕДЕ НА СООБЩЕСТВО КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ

На основе экспериментальных данных (см. рис. 34) видно, что с повышением концентрации соли наблюдался максимум кислотности при концентрации 0,25 М, а затем снова её снижение.

Также стоит упомянуть, что титрование молока перед добавлением кефирных грибков показало 22,5 единицы Тёрнера, то есть внесение соли в концентрации 1 М и более полностью ингибирует рост как свободно живущих бродильщиков, так и молочнокислых микроорганизмов сообщества кефирных грибков (кислотность не увеличилась, несмотря на внесение кефирных грибков).

Отдельно стоит отметить, что образец, культивируемый при концентрации соли 0,75 М оказался самым вязким, это говорит о повышенном синтезе полисахаридов некоторыми участниками консорциума, что, возможно, является защитным механизмом от осмотического стресса.

Интересным также является тот факт, что небольшая концентрация соли в среде (0,25 М) значительно повышает выход органических кислот. Возможно два объяснения этого явления: несколько более высокое осмотическое давление является предпочтительным для продуцентов органических кислот, либо оно ингибирует рост тех микроорганизмов сообщества, которые используют органические кислоты в качестве субстрата.

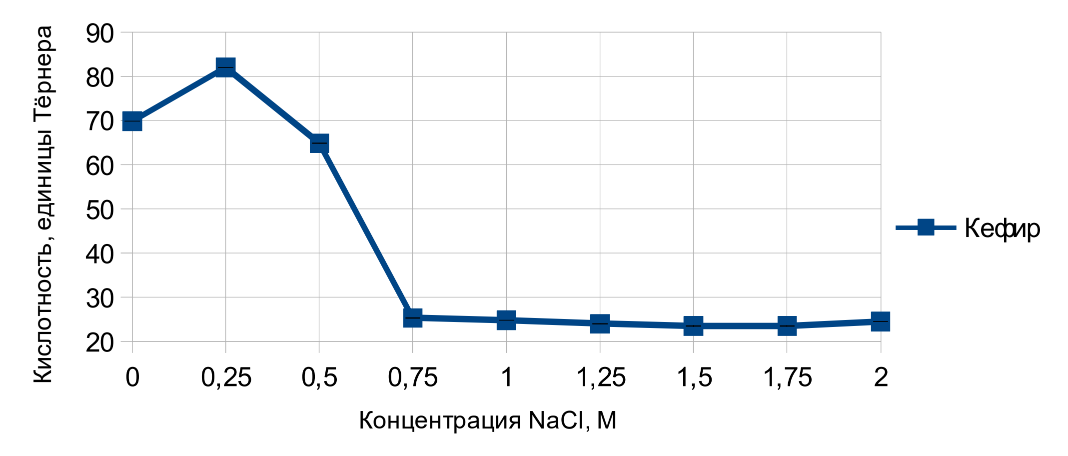


Рисунок 34: Кислотность кефира после 24 часов культивирования при различных концентрациях хлорида натрия в среде

4.3.3 ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЛАНЫ ПО СОВМЕСТНОМУ КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ И ГРАНУЛООБРАЗУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ СООБЩЕСТВА КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ

В дальнейшем будет выделены чистая культура грибков, образующих строму кефирных зерен и кефиранообразующие бактерии. Затем будет проведено их совместное культивирование с селекционным штаммом с целью получения естественно иммобилизованных клеток-продуцентов.

В случае неудачи планируется сократить видовой состав не гранулообразующих микроорганизмов кефирных грибков с помощью антибиотиков для снижения побочных метаболических путей и дальнейшего механического внедрение штамма-продуцента.

5 ВЫВОДЫ

1. Методом селекции с давящим гравитационным отбором был получен оседающий агрегирующий штамм Lactobacillus paracasei 4079, незначительно отличающийся по форме клеток.

2. Сравнение биохимических особенностей исходного и селекционного штамма показало, что в одинаковых условиях они ведут себя практически идентично. Это говорит о том, что методом селекции удалось получить дополнительное свойство (способность к агрегации) без потери каких-либо других свойств.

3. Сообщество кефирных грибков является сложной системой, на функционирование которой влияет широкий спектр факторов (значительно больше чем на монокультуры), что дополнительно усложняет её исследование и воспроизводимость результатов.

6 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. ГОСТ 3624-92. Межгосударственный стандарт. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности.
2. Градова Н.Б., Саранцева А.А. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОГО ПРОФИЛЯ СТРУКТУРИРОВАННОЙ АССОЦИАТИВНОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ – КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – том 14. – №5(3). – С. 704 – 710.
3. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ РОДА LACTOBACILLUS Точилина А.Г., Белова И.В., Соловьева И.В., [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5.
4. Левченко Е.В., Чернышева Н.Л.. ПРОИЗВОДСТВО БИОРАЗЛАГАЕМОГО ПОЛИМЕРА ПОЛИЛАКТИДА // Вестник молодежной науки . – 2016. – С. 1 – 5.
5. Погрельчук О.Е., Мухитова М.Э. РАЗНООБРАЗИЕ БИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ В БИОСФЕРЕ // Ветеринарные и биологические науки. – материалы международной студенческой научной конференции. – С. 79 – 81.
6. Похиленко В.Д., Перелыгин В.В. ПРОБИОТИКИ НА ОСНОВЕ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ И ИХ БЕЗОПАСНОСТЬ Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2–3. – С. 20 – 41.
7. Хохлачева А.А. Кефирные грибки как ассоциативная культура микроорганизмов.: дис. … канд. био. Наук: 03.01.06
8. A Metabolic Sensor Governing Cell Size in Bacteria / Richard B. Weart, Amy H. Lee, An-Chun Chien et. al. // Cell. – 2007. – Vol. 130. – P. 335–347.
9. Acid stress suggests different determinants for polystyrene and HeLa cell adhesion in Lactobacillus casei / N. Haddaji, S. Khouadja, K. Fdhila et. al. // Journal of Dairy Science. – 2015. – Vol. 98, №7. – P. 4302 – 4309.
10. Adam Wasko, Magdalena Polak-Berecka, Roman Paduch, Krzysztof Jozwiak. The effect of moonlighting proteins on the adhesion and aggregation ability of Lactobacillus helveticus // Anaerobe. – 2014. – Vol. 30. – P. 161. – 168.

11. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications / Rishiram Ramanan, Byung-Hyuk Kim, Dae-Hyun Cho et. al. // Biotechnology Advances. – 2016. – Vol. 34. – P. 14 – 29.

12. Analysis of the Lactobacillus casei supragenome and its influence in species evolution and lifestyle / Jeff R Broadbent, Eric C Neeno-Eckwall, Buffy Stahl et. al. // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 13 – P 1 – 18.

13. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / Niels Høiby, Thomas Bjarnsholt, Michael Givskov et. al. // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2010. – Vol. 35. – P. 322 – 332.

14. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract / Kamila Leite Rodrigues, Luc´elia Rita Gaudino Caputo, Jose Carlos Tavares Carvalho et. al. // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2005. – Vol. 25. – P. 404–408.

15. Atsushi Kouzuma, Kazuya Watanabe. Exploring the potential of algae/bacteria interactions // Current Opinion in Biotechnology. – 2015. – Vol. 33. – P.125 – 129.

16. Barry Goldman, Swapna Bhat, Lawrence J. Shimkets. Genome Evolution and the Emergence of Fruiting Body Development in Myxococcus xanthus // PLoS ONE. – 2007. – Vol. 12. – P.1 – 9.

17. Biosythesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in Streptomyces noursei ATCC 11455: analysis of the gene cluster deduction of the biosynthetic pathway / Trygve Brautaset, Olga N. Sekurova. Havard Sletta et. al. // Chemistry & Biology. – 2000. – Vol. 7. – №6. – P. 395 – 403.

18. Bo Liu1, Mihai Pop ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database // Nucleic Acids Research. – 2009. – Vol. 37. – P. 443–447.

19. Bradford D. Martin, Ernest Schawab. Symbiosis: "Living Together" in Chaos // Studies in history of biology. – 2012. – Vol. 4. – №4. – P. 7 – 24.

20. Brian V. Jones, Robert Young, Eshwar Mahenthiralingam, David J. Stickler. Ultrastructure of Proteus mirabilis Swarmer Cell Rafts and Role of Swarming in Catheter-Associated Urinary Tract Infection // Infection and Immunity – 2004. – Vol. 72. – №7. – P. 3941 – 3950.

21. C. B. van Niel. On t h e morphology and physiology of the purple and green sulfuphur bacteria. 1931. c 79 – 93.

22.Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments / Heather K. Allen, Justin Donato, Helena Huimi Wang et. al. // Nature Reciews| Microbiology. – 2010. – Vol. 8. – P. 251 – 259.

23.Candidatus Magnetoglobus multicellularis, amulticellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment / Fernanda Abreu, Juliana Lopes Martins, Thaı´s Souza Silveira et. al. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2007. – Vol. 57. – P. 1318–1322.

24.CARL R. WOESE. Bacterial Evolution // Microbiological Reviews. – 1987. – Vol. 51. – №2. – P. 221 – 271.

25.Claire Moliner, Pierre-Edouard Fournier, Didier Raoult. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution // FEMS Microbiol Rev. – 2010. – Vol. 34. – P. 281 – 294.

26.Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases L Silvia Munoz-Price, Laurent Poirel, Robert A Bonomo et.al.// Lancet Infectional Disieses. – 2013. – Vol. 13. – P. 785–796.

27.Cristina Garcıá, Manuel Rendueles, Mario Dıáz. Microbial amensalism in Lactobacillus casei and Pseudomonas taetrolens mixed culture // Bioprocess Biosyst Eng. – 2017.

28.Daniel Lo´pez, Hera Vlamakis, Roberto Kolter. Biofilms // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2010. – Vol. 10. – P. 1 – 12.

29.DAVID L. KIRK. Seeking the Ultimate and Proximate Causes of Volvox Multicellularity and Cellular Differentiation // INTEGR. COMP. BIOL. – 2003. – Vol. 43. – P. 247–253.

30.David L. Valentine. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea // Nature Reviews | Microbiology. – 2007. – Vol. 5. – P. 316 – 323.

31.Douglas N. Fish. Optimal antimicrobial therapy for sepsis // Am J Health-Syst Pharm. – 2002. – Vol. 59. – P. 13 – 19.

32.Edward F. DeLong, Norman R. Pace. Environmental Diversity of Bacteria and Archaea // Systematic . Biology. – 2001. – Vol. 50. – №4. – P. 470 – 478.

33.Enhanced Acid Tolerance in Bifidobacterium longum by Adaptive Evolution: Comparison of the Genes between the Acid-Resistant Variant and Wild-Type

Strain Yunyun Jiang, Fazheng Ren, Songling Liu et. al. / J. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – Vol. 26, №3. – P. 452–460.

34. Enrique Flores, Antonia Herrero. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria // Nature Reviews | Microbiology. – 2010. – Vol. 8. – P. 39 – 50.

35. Eva R. Kashket. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance // FEMS Microbiology Reviews. – 1987. – Vol. 46. – P. 233 – 244.

36. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities / Alfons J. M. Stams, Frank A. M. de Bok, Caroline M. Plugge et. al. // Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 8, №3. – P. 371 – 382.

37. Fernando Lopitz-Otsoa, Aitor Rementeria, Natalia Elguezabal, Javier Garaizar. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healty capabilities. // Rev. Iberoam Micol. – 2006. – Vol.23. – P. 67 –74.

38. Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances / Christian Pfeffer, Steffen Larsen, Jie Song et. al. // Nature. – 2012. – Vol. 491. – P. 218 – 221.

39. Genome adaptive evolution of Lactobacillus casei under long-term antibiotic selection pressures / Jicheng Wang, Xiao Dong, Yuyu Shao et. al. // BMC Genomics. – 2017. – Vol. 18, №320 – P. 1 – 8.

40. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus Penicillium chrysogenum / Marco A van den Berg, Richard Albang, Kaj Albermann et. al. //Nature Biotechnology. – 2008. – Vol. 26, №10. – P. 1161 – 1168.

41. Genomic Adaptation of the Lactobacillus casei Group / Hidehiro Toh, Kenshiro Oshima, Akiyo Nakano et. al. // Plos one. – 2013. – Vol. 8, №10. – P. 1 – 11.

42. Gianluca Corno, Klaus Ju¨rgens. Direct and Indirect Effects of Protist Predation on Population Size Structure of a Bacterial Strain with High Phenotypic Plasticity // Applied and environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72. – №1. – P. 78 – 86.

43. Havva Ekmekcçİ, Belma Aslim, Derya Onal Darilmaz. Some factors affecting the autoaggregation ability of vaginal lactobacilli isolated from turkish women // Arch. Biol. Sci. – 2009. – Vol. 61. – №3. – P. 407 – 412.

44. Ilana Zilber-Rosenberg, Eugene Rosenberg. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenometheory of evolution // FEMS Microbiol Rev. – 2008. – Vol. 32. – P. 723 – 735.

45. Invasive Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections in the United States / R. Monina Klevens, Melissa A. Morrison, Joelle Nadle, MPH et. al. // Journal of American Medical Association. – 2007. – Vol. 298, №15. – P. 1763 – 1771.

46. Investigation of Factors Affecting Aerobic and Respiratory Growth in the Oxygen-Tolerant Strain Lactobacillus casei N87 / Rocco G. Ianniello, Teresa Zotta, Attilio Matera et. al. // Plos one. – 2016. – Vol. 10. – P. 1 – 19.

47. James R. Jonson, Thomas A. Russo. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: “The other bad E coli” // Jornal of Laboratory Clinical Medicine. – 2002. – Vol. 139. – P. 155 – 162.

48. James W. Moulder. Comiparative Biology of Intracellular Parasitism // Microbiological Reviews. – 1985. – Vol. 49. – №3. – P. 298 – 337.

49. Jeffrey G Lawrence, Heather Hendrickson. Genome evolution in bacteria: order beneath chaos // Current Opinion in Microbiology. – 2005. – Vol. 8. – P. 572–578.

50. Jerilyn A. Timlin, Danae Maes. Effects of Vampirovibro Chorellavorus on Chlorella Sorokiniana DOE Strain 1044 // Sandia National Laboratories. – 2019.

51. JoAnne Engebrecht, Kenneth Nealson, Michael Silverman. Bacterial Bioluminescence: Isolation and Genetic Analysis of Functions from Vibrio fischeri // Cell. – 1983. – Vol. 32. – P. 773 – 781.

52. John H. Koschwanez, Kevin R. Foster, Andrew W. Murray. Sucrose Utilization in Budding Yeast as a Model for the Origin of Undifferentiated Multicellularity // PLoS Biology. – 2011. – Vol. 9. – №8. – P. 1 – 11.

53. Johnatan Braun. Unsettling Facts of Life: Bacterial Commensalism, Epithelial Adherence, and Inflammatory Bowel Disease // Gastroenterology. – Vol. 122. – №1. – P228 – 230.

54. José L. Martínez. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments // Science. – 2008. – Vol 321. – P. 365 – 370.

55. Judith A. Piermaria, Mariano L. de la Canal, Analı´a G. Abraham. Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain // Food Hydrocolloids – 2008. – Vol. 22. – P. 1520–1527.
56. Julian Davies, Dorothy Davies. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance // Microbioligy and Mocecular biology Reviews. – 2010. – Vol. 74. – №3. – P. 417 – 433.
57. Kin Discrimination Increases with Genetic Distance in a Social Amoeba / Elizabeth A. Ostrowski, Mariko Katoh, Gad Shaulsky et. al. // PLoS Biology. – 2008. – Vol. 6, №11. – P.2376 – 2382.
58. L. Micheli á D. Uccelletti á C. Palleschi á V. Crescenzi, Isolation and characterisation of a ropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide keran // Appled Microbiology Biotechnology. – 1999. – Vol. 53. – P. 69 – 74.
59. Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus subsp. nov., isolated from Indian dairy products / Franco Dellaglio, Giovanna E. Felis et. al. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2005 – Vol. 55 – P. 401–404.
60. Lactobacillus kefiranofaciens sp. nov. Isolated from Kefir Grains / Tomohiko Fujisawa, Susumu Adachl, Takahiro Toba et. al. // International journal of systematic bacteriology. – 1988. – Vol. 38, №1. – P. 12 – 14.
61. Lower Antibody Levels to Staphylococcus aureus exotoxins Are Associated With Sepsis in Hospitalized Adults With Invasive S. aureus Infections / Rajan P. Adhikari, Adebola O. Ajao, M. Javad Aman et. al. // The Journal of Infectious Diseases. – 2012. – Vol. 206. – P. 915 – 923.
62. M . Alexander. Biochemical ecology of soil microorganisms // Annual. Rev. Microbiol. – 1964. – Vol. 18. – P. 217-250.
63. M. RADMAN, F. TADDEI, I. MATIC. DNA Repair Systems and Bacterial Evolution // Cold Spring Harbor Symposia. – 2000. – Vol. 65. – P. 11 – 20.
64. Mary J Osborn, Lawrence Rothfield. Cell shape determination in Escherichia coli // Current Opinion in Microbiology. – 2007. – Vol.10. – P. 606–610.
65. Maryvonne Dho-Moulin, John Morris Fairbrother. Avian pathogenic Escherichia coli (APEC) // Veterinary Research, BioMed Central. – 1999. – Vol. 30. – № 2-3. – P. 299-316.

66. Matthew R. Parsek, E.P. Greenberg. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms // TRENDS in Microbiology. – 2005. – Vol. 13, №1. – P. 27 – 33.

67. Michal Čáp, Libuše Váchová, Zdena Palková. Reactive Oxygen Species in the Signaling and Adaptation of MulticellularMicrobial Communities // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2012. – P.1 – 13.

68. Multicellular life cycle of magnetotactic prokaryotes / Carolina N. Keim, Juliana L. Martins, Fernanda Abreu et.al. // FEMS Microbiology Letters. – 2004. – Vol. 240. – P. 203–208.

69. Nancy A. Moran. Symbiosis // Current Biology. – 2006. – Vol. 16. – №20. – P. 866 – 871.

70. Neisseria meningitidis NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells / Barbara Capecchi, Jeannette Adu-Bobie, Federica Di Marcello et. al. // Molecular Microbiology. – 2005. – Vol. 55, №3. – P. 687 – 698.

71. Nicholas A Lyons, Roberto Kolter On the evolution of bacterial multicellularity // Current Opinion in Microbiology. – 2015. – Vol. 24 – P. 21 – 28.

72. P. Kooiman. The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of kefir grain // Carbohydrate Research. – 1968. – Vol. 7. – P. 200 – 211.

73. Panagiota Mylona, Katharina Pawlowski, Ton Bisseling. Symbiotic Nitrogen Fixation // The Plant Cell. – 1995. – Vol. 7. – P. 869 – 885.

74. Physiological and transcriptional responses and cross protection of Lactobacillus plantarum ZDY2013 under acid stress / Renhui Huang, Mingfang Pan, Cuixiang Wan et. al. // Journal of Dairy Science. – 2016. – Vol. 99. – №2. – P. 1002 – 1010.

75. Predatory activity of Myxococcus xanthus outer-membrane vesicles and properties of their hydrolase cargo / Alun G. L. Evans, Hazel M. Davey, Alan Cookson et. al. // Microbiology. – 2012. – Vol. 158. – P. 2742 – 2752.

76. Predatory prokaryotes: Predation and primary consumption evolved in bacteri / Ricardo Guerrero, Carlos Pedrós-Alió, Isabel Esteve // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1986. – Vol. 83. – P. 2138 – 2142.

77. R. P. Mortlock. Experiments in Evolution Using Microorganisms // BioScience. – 1983. – Vol. 33. – №5. – P. 308 – 313.

78. Robert D. Perry, Jacqueline D. Fetherston. Yersinia pestis—Etiologic Agent of Plague // Clinical Microbiology Reviews. – 1997. – Vol. 10. – №1. – P. 35 – 66.

79. Robert W. Hutkins, William L. Ellefson, Eva R. Kashket. Betaine Transport Imparts Osmotolerance on a Strain of Lactobacillus acidophilu // Applied and Environmental Microbiology. – 1987. – Vol. 53. – №10. – P. 2275 – 2281.

80. S. Pommier, P. Strehaiano, M.L. De´lia. Modelling the growth dynamics of interacting mixed cultures: a case of amensalism // International Journal of Food Microbiology. – 2005. – Vol. 100. – P. 131–139.

81. Santiago F. Elena, Richard E. Lenski. Evo;ution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaption // Nature Reviews | Genetics. – 2003. – Vol. 4. – P. 457 – 469.

82. Sara Hooshangi, William E Bentley. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications // Current Opinion in Biotechnology. – 2008. – Vol. 19. – P. 550 – 555.

83. Seymour S. Cohen. Molecular Bases of Parasitism of some Bacterial Viruses // Science. – 1956. – Vol. 123. – P. 653 – 656.

84. Shengyong Mao, Mengling Zhang, Junhua Liu, Weiyun Zhu. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 10. – P. 1 – 14.

85. Sheryl S. Justice, David A. Hunstad, Lynette Cegelski, Scott J. Hultgren. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy // Nature Reviews | Microbiology. – 2008. – Vol. 6. – P. 162 – 168.

86. Si Yeon Ju, Jin Ho Kim and Pyung Cheon Lee Long-term adaptive evolution of Leuconostoc mesenteroides for enhancement of lactic acid tolerance and production // Biotechnology for Biofuels. – 2016. – Vol. 9, №240. – P. 1 – 12.

87. Stanley L. Miller. A Production of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions // Science. – 1953. – Vol. 117. – P. 528 – 529.

88. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management / Steven Y. C. Tong, Joshua S. Davis, Emily Eichenberger et. al. // Clinical Microbiology Reviews. – 2015. – Vol. 28. – №3. – P. 603 – 661.
89. Sticking together: building a biofilm the Bacillus subtilis way / Hera Vlamakis1, Yunrong Chai, Pascale Beauregard // Nature Reviews | Microbiology. – 2013. – Vol. 11. – P. 157 – 168.
90. Stochastic dynamics for adaptation and evolution of microorganisms / Sylvain Billiard, Pierre Collet, Régis Ferrière et. al. // 2018.
91. Structural Characterization and Biological Activities of an Exopolysaccharide Kefiran Produced by Lactobacillus kefiranofaciens WT-2BT / Hiroaki Maeda, Xia Zhu, Shiho Suzuki et. al. // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52. – P. 5533-5538.
92. Stuart A. West, Ashleigh S. Griffin, Andy Gardner, Stephen P. Diggle. Social evolution theory for microorganisms // Nature Reviews | Microbiology. – 2006. – Vol. 4. – P. 597 – 607.
93. Stuart A. West, Ashleigh S. Griffin, Andy Gardner, Stephen P. Diggle. Social evolution theory for microorganisms // Nature Reviews | Microbiology. – 2006. – Vol. 4. – P.597 – 607.
94. Systematic and Evolution of Microorganisms: General Concepts / Charles-François Boudouresque, Pierre Caumette, Jean-Claude Bertrand et. al. //Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology. – 2015. – P. 107 – 144.
95. The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria / Siv G. E. Andersson, Alireza Zomorodipour, Jan O. Andersson et. al. // Nature. – 1998. – Vol. 396 – P. 133 – 143.
96. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution / Eugene Rosenberg, Omry Koren, Leah Reshef, et. al. // Nature Reviews | Microbiology. – 2006.7– Vol. 6. – P. 355 – 362.
97. Tim F. Cooper, Daniel E. Rozen, and Richard E. Lenski Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in Escherichia coli // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – Vol. 100. – №3. – P. 1072 – 1077.

98. Tomislav Pogačić, Sanja Šinko, Šimun Zamberlin, Dubravka Samaržija. Microbiota of kefir grains // Mljekarstvo. – 2013. – Vol. 63. – №1. – P. 3 – 14.

99. V. M. Doctors, J. R. Couch. An Unusual Example of Symbiosis in Bacteria // Archives of Biochemistry. – 1954. – Vol. 51. – P. 530 – 531.

100. Virginia Robles Alonso, Francisco Guarner. Linking the gut microbiota to human health // British Journal of Nutrition. – 2013 – Vol. 109. – P.21 – 26.

101. William C. Ratcliff, R. Ford Denison, Mark Borrello, and Michael Travisano. Experimental evolution of multicellularity // PNAS. – 2012. – Vol. 109 – №5. – P. 1595 – 1600.

102. Yersinia pestis, the cause of plague, is a recently emerged clone of Yersinia pseudotuberculosis / Mark Achtman, Kerstin Zurth, Giovanna Morelli et. al. // PNAS. – 1999. – Vol. 96, №24. – P. 14043–14048.